DOCUMENT RESUME

ED 355 342 CE 062 611

TITLE	Manual Laboratorio de Microbiologia. Documento de trabajo Programa de Educacion en Ocupaciones de Salud (Microbiology Laboratory Manual. Curriculum Document. Program of Education in Health Occupations).
INSTITUTION	Puerto Rico State Dept. of Education, Hato Rey. Area for Vocational and Technical Education.
PUB DATE	92
NOTE	77p.
AVAILABLE FROM	Puerto Rico Department of Education, Box 759, Hato Rey, PR 00919.
PUB TYPE	Guides - Classroom Use - Teaching Guides (For Teacher) (052)
LANGUAGE	Spanish
EDRS PRICE	MF01 Plus Postage. PC Not Available from EDRS.
DESCRIPTORS	Allied Health Occupations Education; Bacteria; *Culturing Techniques; Laboratory Manuals; *Microbiology; *Microscopes; Postsecondary Education; *Sanitation; Secondary Education

ABSTRACT

This laboratory manual on microbiology begins with an introduction relating the study of microorganisms to health occupations education and stressing the importance of teaching critical thinking. The introduction is followed by general instructions for the use of the manual and an illustration of hand washing procedures. The 13 laboratory exercises are on the following topics: use of microscopes; characteristics of microorganisms; microorganisms in the environment; slide stains (simple, the Gram method, negative, and special); suspended droplets; test of movement in agar; characteristics of bacteria; culturing media; disinfectants; and tests of susceptibility to antibiotics. Each exercise includes some or all of the following: background information, objectives, equipment, procedures, and illustrations. (SK)

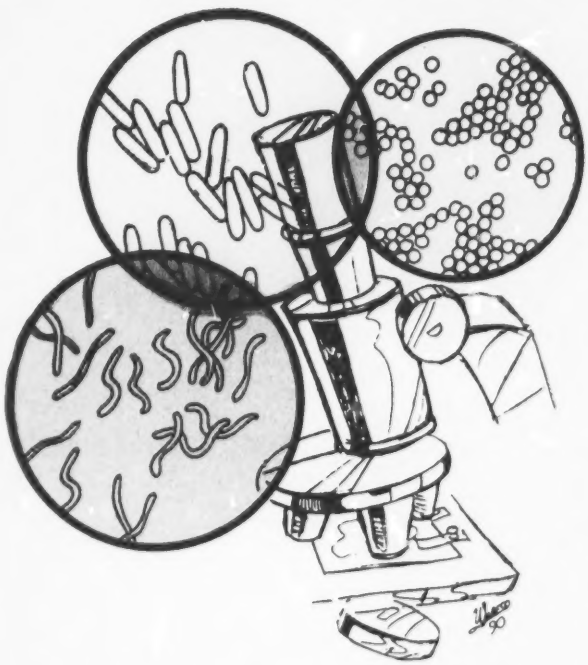
****
* Reproductions supplied by EDRS are the best that can be made *
* from the original document. *
****

ED355342

DEPARTAMENTO DE EDUCACIÓN
ESTADO LIBRE ASOCIADO DE PUERTO RICO
ÁREA DE EDUCACIÓN VOCACIONAL, TÉCNICA Y DE ALTAS DESTREZAS

MANUAL

LABORATORIO DE



MICROBIOLOGÍA

PROGRAMA DE EDUCACIÓN EN OCUPACIONES DE SALUD

U.S. DEPARTMENT OF EDUCATION
Office of Educational Research and Improvement
EDUCATIONAL RESOURCES INFORMATION CENTER (ERIC)
✓ This document has been reproduced as received from the person or organization originating it.
☐ Minor changes have been made to improve reproduction quality.
• Points of view or opinions stated in this document do not necessarily represent official OERI position or policy.

DOCUMENTO DE TRABAJO

1992

"PERMISSION TO REPRODUCE THIS MATERIAL IN MICROFICHE ONLY HAS BEEN GRANTED BY

C Benitez

TO THE EDUCATIONAL RESOURCES INFORMATION CENTER (ERIC)."

Estado Libre Asociado de Puerto Rico
DEPARTAMENTO DE EDUCACIÓN
Área de Educación Vocacional, Técnica y de Altas Destrezas
Hato Rey, Puerto Rico

MANUAL DE LABORATORIO

DE

MICROBIOLOGÍA

DOCUMENTO DE TRABAJO

PROGRAMA DE EDUCACIÓN EN OCUPACIONES DE SALUD

Año 1991-92

Derechos reservados conforme a la Ley
Derecho de Propiedad Literaria ©
DEPARTAMENTO DE EDUCACIÓN
Área de Educación Vocacional, Técnica y de Altas Destrezas
PROGRAMA DE EDUCACIÓN EN OCUPACIONES DE SALUD
1991

ÍNDICE

		Página
Introducción		1
Instrucciones generales.....		2
Procedimiento para lavado de manos.....		5
Laboratorio #1	Uso y manejo del Microscopio.....	6
Laboratorio #2	Características morfológicas de microorganismos.....	11
Laboratorio #3	Microorganismos en nuestro ambiente.....	14
Laboratorio #4	Tinción simple.....	20
Laboratorio #5	Tinción Gram.....	25
Laboratorio #6	Tinciones negativas.....	28
Laboratorio #7	Tinciones especiales.....	30
Laboratorio #8	Gota pendiente.....	32
Laboratorio #9	Prueba de motilidad en agar semi-sólido.....	36
Laboratorio #10	Características fisiológicas bacterianas.....	38
Laboratorio #11	Medios de cultivo.....	41
Laboratorio #12	Agentes desinfectantes.....	46
	Apéndices Laboratorio #12	
	Control microbiano- términos comúnmente usados y su significado.....	50
	Clasificación de Desinfectantes.....	52
Laboratorio #13	Pruebas de susceptibilidad de antibióticos...	55
	Apéndices Laboratorio #13	
	Interpretación de la zona de inhibición.....	63
	Algunos agentes quimioterapéuticos empleados para combatir bacterias patógenas importantes.....	66
Bibliografia.....		68

Introducción

El estudio de los microorganismos nos permitirá conocer la gran variedad de organismos pequeños que entran en contacto con nuestro mundo continuamente. Éstos comparten con nosotros espacio y nutrimentos. Además, mantienen un balance dinámico entre la naruraleza y el ser humano.

Muchos de estos organismos son de gran utilidad, ya que realizan funciones muy beneficiosas para la humanidad. Entre éstas podemos mencionar: la obtención de alimentos por fermentación o degradación bacteriana, la transformación de los desperdicios orgánicos, la depuración de las aguas sucias de las ciudades, y su utilidad en el campo de la medicina.

Otros microorganismos, por el contario, son capaces de causar mucho daño debido a los efectos producidos por las bacterias patógenas. En el pasado existía un gran desconocimiento de estos organismos, por lo que se desarrollaron grandes epidemias a nivel mundial. Hoy en día, aún se desarrollan innumerables condiciones infecciosas en todo el mundo, debido al limitado control que de dichas bacterias existe en los países subdesarrollados. En estos lugares se carece de medicamentos y fondos para sostener una política pública adecuada en el área de la salud. Enfermedades como: lepra, tuberculosis, cólera, tifoidea, disentería, peste, tularemia, tifus, neumonia, meningitis y otras, que mayormente ocurren en dichas regiones, son los principales temas de discusión en la Organización Mundial de la Salud. Otro tema de análisis y motivo de gran preocupación para dicha organización son las enfermedades infecciosas sexualmente transmisibles que ocurren en las sociedades desarrollas. Enfermedades como la sífilis y la gonorrea aún no se han erradicado y por años se han mantenido entre las condiciones más persistentes. Gracias al gran desarrollo obtenido por la microbiología en todos estos años, se han podido dar guías mejores y más precisas para la detección, control y utilización más eficaz de los medicamentos y recursos existentes.

En este curso se les brinda a los (as) estudiantes la oportunidad de realizar laboratorios en los cuales se estudiarán los conceptos básicos relacionados con la forma, función, clasificación, identificación e inhibición de los microorganismos.

Esperamos que al observar a través del microscopio este interesante mundo inimaginado por muchos, les sirva de estímulo y les motive a continuar estudiándolo, tal como lo hicieron Leewenhoek, Pasteur, Kock y Lister.

Es importante que el (la) maestro (a), a la vez que imparte los conocimientos relacionados con la materia que enseña, enfatice el desarrollo del pensamiento crítico, la pertinencia de la educación, y la importancia de los valores en la vida humana. De esta forma podrá lograr que los (as) estudiantes aumenten sus potencialidades para alcanzar su realización como personas y puedan, inteligente y responsablemente, desempeñarse en esta era de cambios y de avances tecnológicos acelerados.

Instrucciones generales

1. El (la) estudiante debe familiarizarse previamente con el ejercicio que va a realizar, leyendo el laboratorio correspondiente y las referencias que aparecen en el libro de texto.

2. Las instrucciones preliminares, así como las demostraciones, se ofrecerán al comienzo de cada ejercicio. Es necesario llegar a tiempo, estar preparado(a) para hacer preguntas relacionadas con el procedimiento a realizar y entender el propósito del mismo.

3. El (La) estudiante debe anotar los resultados u observaciones en una forma precisa y detallada en su correspondiente libreta de laboratorio u hoja de reporte, previamente especificada por el (la) instructor (a) o profesor (a) de laboratorio.

4. El (la) estudiante debe estar preparado (a) para contestar pruebas cortas, escritas u orales, relacionadas con los procedimientos que se van a estudiar, con los ya estudiados y de los resultados de los ejercicios asignados.

5. La asistencia al laboratorio es compulsoria para la aprobación del curso de Microbiología en su totalidad. No se repondrán laboratorios ni se podrá cambiar de secciones durante la duración del curso. Sea puntual.

6. El (La) estudiante se relacionará con la ubicación y disposición de las facilidades en el laboratorio y aprenderá a utilizar los equipos de seguridad existentes. Esto lo logrará el primer día que asista al mismo.

A. Normas a seguir para lograr manejabilidad y seguridad en el laboratorio

1. Use una bata de laboratorio con mangas largas en todo periodo de laboratorio, de lo contrario no se permitirá el acceso al mismo. Esta debe mantenerse abotonada.

2. Lave sus manos bien, antes y después de cada periodo de laboratorio con un buen agente antiséptico.

3. Limpie bien su área de trabajo con un desinfectante, antes y después de cada periodo de laboratorio.

   a. Si derrama alguna solución o substancia contaminada sobre la superficie de la misma, marque el área con un lápiz de cera rojo (para no olvidar el área) y cubra con un buen agente desinfectante. NOTIFIQUE A SU INSTRUCTOR(A) INMEDIATAMENTE.

4. Mantenga sus manos fuera del área de la cara. Cuide o proteja sus ojos y la boca.

5. No coma ni fume en el laboratorio.

6. Conserve su área de trabajo recogida y limpia. Solamente deben encontrarse en ella los materiales y equipos indispensables para realizar su labor. El equipo de su propiedad debe colocarlo debajo de la mesa o en una esquina del salón, donde no estorbe. Si existe un tablillero o "locker" debe colocarlo allí.

7. Los accidentes personales, tales como cortaduras, quemaduras o contaminación corporal, deben ser notificados inmediatamente al (a la) instructor(a). EVITE ACCIDENTES.

8. Disponga del material contaminado en los recipientes y lugares provistos por el laboratorio. Pregunte antes de botar algo.

9. Recuerde reportar a su instructor(a), de forma inmediata, la presencia de algún equipo o material roto, dañado o maltrecho, antes, durante o después de trabajar con los mismos.

10. Guarde todo el equipo o material reusable en su lugar correspondiente al finalizar su uso.

11. Apague los mecheros cuando no estén en uso. Revise la llave del gas para que permanezca cerrada al finalizar su trabajo.

12. No saque el material contaminado fuera de las facilidades, tampoco deambule con los mismos.

13. Mantenga su cabello controlado o atado en todo momento, observando mucha precaución si está usando un mechero.

14. Hable lo menos posible durante la ejecución de su laboratorio, teniendo en cuenta que está utilizando microorganismos vivos.

15. No deje cultivos en tubos de ensayo o placas de Petri que estén en proceso de incubación, en ningún lugar que no sea su área de trabajo.

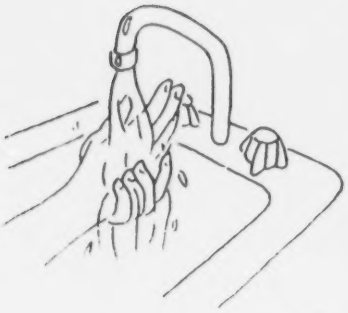
16. Recuerde incinerar su aguja de inocular antes y después de realizar su trabajo.

17. Rotule cuidadosamente los medios de cultivos utilizados, colocando de manera clara su nombre, número de sección, fecha, hora, género y especie del organismo utilizado.

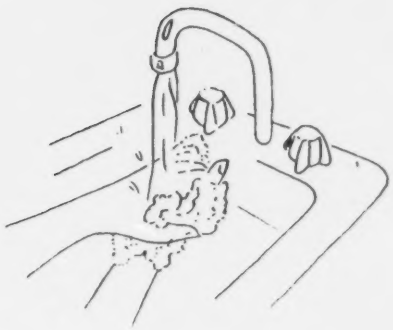
18. Al utilizar su microscopio, asegúrese de limpiar los lentes antes y después de trabajar con ellos.

RECUERDE: Las manos son un medio de transferencia de microorganismos y por ende, de transferencia mecánica. La misma puede ocurrir del laboratorio a la nariz o la boca, o del laboratorio a otra persona. Esta es una de las razones por la cual es absolutamente necesario que usted se lave las manos correctamente con una solución desinfectante antes y después de cada ejercicio de laboratorio. Esto remueve el sucio, elimina la contaminación y mantiene el equipo y el laboratorio limpio. Para este propósito, utilice una solución de Lysol al 2% o desinfectante más moderado a la sensitividad de la piel, como el Phisoderm.

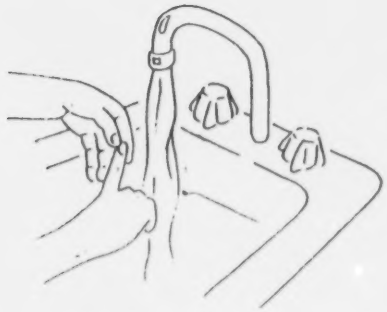
PROCEDIMENTO PARA EL LAVADO DE MANOS



1. Humedezca sus manos y muñeca con agua.



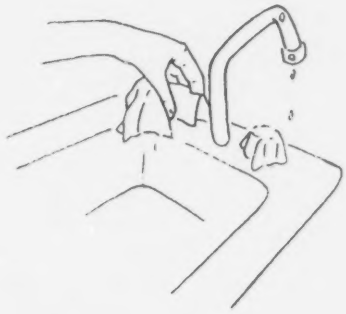
2. Frote sus manos vigorosamente con jabón desinfectante por 1 ó 2 minutos.



3. Dé especial atención a sus dedos y uñas.

4. Lave sus manos con agua dejando la misma correr.

6. Seque sus manos con papel toalla limpio.



7. Cierre la pluma con el papel toalla.

Laboratorio núm. 1

Uso y manejo del microscopio

Introducción: Microscopio compuesto, de campo claro

El desarrollo de la microbiología como una ciencia, se inicia aproximadamente con el descubrimiento de la existencia de los microorganismos. Éstos son organismos cuya estructura anatómica no puede ser observada a simple vista, aunque, bajo ciertas condiciones, podemos detectar macroscópicamente su presencia cuando forman agregados coloniales. Con la invención del instrumento óptico conocido como microscopio, (atribuido a Zacharias Janssen - 1590) se hace posible la observación de los mismos. Hombres de la talla de Anthon Van Leeuwenhock, Louis Pasteur y Robert Koch, entre otros, nos alertaron de la presencia de un mundo microscópico a nuestro alrededor. El mismo, está poblado por organismos de tamaño minúsculo y sencilla organización celular, pero, que no obstante, ejercen una gran influencia sobre aspectos fundamentales de nuestra vida, tales como la salud, la alimentación, el equilibrio de ecosistemas y otros.

El conocimiento que hasta ahora se ha acumulado con la ayuda del microscopio y otros medios de investigación nos ha permitido identificar y establecer una jerarquía taxonómica para los microorganismos. En adición, con los adelantos en material de óptica (lentes) que se han logrado hoy día y que al momento culminan con la invención del microscopio electrónico, estamos en posición de poder entender la relación entre la estructura y función los organelos y demás inclusiones citoplásmicas en los microorganismos. Si unimos estos logros al desarrollo acelerado de la biología molecular podemos explicar cómo se han producido los avances en el campo de la diagnosis y terapia de enfermedades infecciosas y el control de las actividades metabólicas de los microorganismos para generar antibióticos, hormonas, alimentos, licores y otros productos de gran utilidad para el hombre.

De acuerdo con lo mencionado anteriormente, debemos considerar el microscopio como una herramienta útil y necesaria para todo aquél que desee incursionar en el fascinante mundo de los microorganismos. Con su ayuda podemos observar la forma, el tamaño y las estructuras especiales de éstos. No obstante, debemos también señalar que nuestra experiencia con los microorganismos podrá ser una valiosa y agradable o totalmente frustrante, dependiendo de nuestra habilidad en el manejo del microscopio. Para hacer buen uso del mismo debemos conocer mejor las partes que lo componen, la función que realizan y cómo éstas se integran para producirnos una imagen amplificada del espécimen observado.

Nuestro microscopio es uno compuesto, de campo claro (de luz visible). Existen muchas variaciones del mismo, pero los principios de óptica que rigen a todos estos instrumentos son iguales, lo que puede variar es la fuente de luz como es el caso del microscopio de luz ultravioleta y el electrónico que utiliza un haz de electrones. En otros casos lo que varía es el condensador, con el propósito de desviar la luz visible que toca la muestra; este es el caso del microscopio de campo obscuro, donde se inyectan tintes fluorescentes y el de fase y contraste, que proyecta luz al medio donde está la muestra y no a la muestra. En general, éstas son las variaciones. Un microscopio compuesto consiste básicamente de dos sistemas de lentes, una fuente de iluminación cuya intensidad puede ser controlada y un engranaje mecánico que controla la distancia en el sistema de lentes y el espécimen observado.

La magnitud que provee el microscopio compuesto es el resultado de la utilización de dos sistemas de lentes: los objetivos (sistema de lentes localizado por encima de la plataforma, donde se coloca la muestra) y el ocular (lente de la parte superior del microscopio por donde se observa). La anteposición de estos va a lograr el aumento o ampliación de una imagen. Para lograr diferentes magnitudes, el microscopio compuesto presenta variaciones en los lentes objetivos. Estos pueden obtenerse de cuatro diferentes dimensiones. Su utilización depende de la amplitud total a la cual se observa un espécimen a través del microscopio. Es necesario multiplicar las amplitudes independientes del lente ocular y lente objetivo. Amplitud total = Amplitud ocular X Amplitud objetivo.

Podemos llegar a pensar que es posible aumentar la imagen de un espécimen al infinito, simplemente aumentando el poder de amplitud del ocular y el objetivo. No obstante, el poder de amplitud de los lentes está limitado por un fenómeno conocido como poder de resolución. Este fenómeno depende de ciertas propiedades de los lentes utilizados y de la fuente de luz utilizada; por lo tanto, el microscopio tiene dos funciones:

a. Aumentar la imagen (amplificación)
b. Definición clara de la imagen (poder de resolución)

El microscopio es un instrumento de gran utilidad cuando se utiliza adecuadamente. El obtener un buen enfoque es esencial para el estudio del material a observarse. Muchos estudiantes utilizan este instrumento incorrectamente y tienden a dibujar lo primero que ven, sin asegurarse de que sea la imagen correcta de lo que se espera que observen.

Para la mayoría de las muestras a observarse en este curso, se utilizará el objetivo de 100x que utiliza un aceite de cedro especial (refracción igual al aire) llamado **aceite de inmersión.** El uso de este aceite elimina la posible pérdida de luz hacia la muestra y a su vez actúa como lente condensador, recogiendo y enviando la luz hacia el lente objetivo para poder lograr poder de resolución.

Organismos Procariotas y Eucariotas

Desde que el hombre empezó a estudiar los animales, intentó clasificarlos. Hasta el momento de la invención del microscopio todo organismo vivo se clasificaba en dos reinos: **animal y vegetal.** Al empezar a descubrir un nuevo mundo de organismos vivos se abrió la puerta para otro reino, a éste le llamaron **protista,** en donde acomodaban a todos los organismos que no eran animal o planta. En este reino se encontraban todos los organismos microscópicos incluyendo los unicelulares. Por ser una idea nueva, los científicos de la época pensaron que éstas eran las formas de vida más primitivas o las primeras de donde todas las demás habían surgido. Pasados los años estas variedades de organismos, por sus características, no cabían en el reino protista, y fueron incluidos otros reinos como: **hongos y mónera,** modaron a todos los organismos que mayormente diferían en composición. Los científicos observaron las estructuras celulares y se dieron cuenta que en los reinos animal, vegetal y protistas, habían organismos que presentaban una estructura u organelo llamado **núcleo** y en otros no se podía apreciar. A los que tenían núcleo le llamaron **eucariota** (con núcleo) y a los que no tenían le llamaron **procariota** (organismo primitivo carente de núcleo). Al añadir los reinos entonces notaron que en el único reino que encontraron procariotas era en el mónera, en los demás, aún las formas unicelulares, eran eucariotas.

El reino mónera agrupa todas las formas bacterianas encontradas:

a. Cianobacterias- Las bacterias verde azules, parecidas a las algas por tener organelos capaces de realizar fotosíntesis.

b. Eubacterias- Bacterias verdaderas donde se encuentran las ambientales y las patógenas.

Las bacterias son microorganismos muy pequeños. Su tamaño se expresa en una medida conocida como **micrón** (M). Esta medida es igual a una milésima parte de un milímetro (1/1,000) y a una diezmilésima parte de un centímetro (1/10,000), lo que equivale a una veinticincomil cuatrocientas partes de una pulgada (1/25,400). El tamaño de las bacterias varía de especie en especie. La mayor parte de las bacterias a estudiarse tienen un largo de alrededor de 1 a 5 micrones.

Las formas de las bacterias también varían, y de acuerdo con estas variaciones se clasifican en tres grupos:

a. **Bacilos:** bacterias alargadas en forma de bastón.
b. **Cocos:** bacterias redondas.
c. **Helicoides:** formas en espiral.

Las bacterias pueden presentar arreglos especiales o combinarse de diferentes maneras entre sus respectivas especies:

Arreglo:

1. Bacilos:

   a. Vida libre: solos
   b. Diplobacilos: dos bacilos juntos
   c. Streptobacilos: en fila india, como cadenas

2. Cocos:

   a. Vida libre: solos
   b. Diplococos: dos cocos juntos
   c. Streptococos: parecido a un collar de perlas
   ch. Staphylococos: en ramilletes como uvas
   d. Tétradas: de cuatro en cuatro
   e. Sarcinas: en grupos de ocho

3. Helicoides: son de vida libre

Objetivos

1. Adquirir destrezas en el manejo del microscopio.
2. Adquirir destrezas en el manejo del objetivo de 100x o inmersión en aceite.
3. Definir y entender los conceptos de ampliación y poder de resolución.
4. Poder diferenciar entre organismos eucariotas y procariotas.
5. Poder visualizar los conceptos de tamaño, forma y arreglo espacial en las bacterias.

Materiales

1. Microscopio binocular
2. Papel de lente
3. Papel absorbente
4. Aceite de inmersión (de alta resolución)
5. Laminillas preparadas de:

   a. Amoeba proteus
   b. Paramecium caudatum
   c. Bacilus subtillis
   ch. Staphylococcus epidermidis
   d. Lophotricous flagella

Procedimiento

1. El (La) instructor(a) explicará la técnica de enfoque para el uso del microscopio.

2. El (La) instructor(a) explicará el uso del objetivo de 100x con aceite de inmersión.

3. El (La) estudiante:

   a. Practicará las destrezas aprendidas viendo las laminillas preparadas escogidas para el laboratorio.

   b. Demostrará a su instructor (a) sus observaciones, al enfocar y al preparar su respectivo dibujo.

   c. Identificará y clasificará sus muestras entre células procariotas y eucariotas.

Laboratorio núm. 2

Características morfológicas de los microorganismos

Introducción:

Como mencionamos en el laboratorio anterior, las bacterias pueden tener forma de bacilo, coco y helicoidales. Para este laboratorio, además de la información dada en el laboratorio anterior, debemos mencionar que las helicoidales se pueden diferenciar entre una y otra por los espirales o hélices, rigidez del cuerpo y las estructuras que tengan para movimiento.

Helicoidales:

1. Espirilos- Son rígidos, presentan de uno a tres espirales, pueden tener flagelos.

2. Espiroquetas- Son flexibles, presentan más de tres espirales y pueden moverse plegando sus espirales o por flagelos.

3. Vibrios- Son rígidos y pequeños como una comilla (,) pueden tener flagelos.

Se estudiarán bacterias patógenas (que causan enfermedades) como el agente causal de la gonorrea, sífilis, tuberculosis, tétano, meningitis, botulismo, etc.

Objetivos:

1. Seguir practicando con el objetivo de 100x.
2. Repasar las formas, tamaño y arreglo bacteriano.
3. Identificar formas patógenas.

Materiales:

1. Microscopios binoculares
2. Papel de lente
3. Papel absorbente
4. Aceite de inmersión (de alta resolución)
5. Laminillas preparadas de:

   a. Bacillus cereus
   b. Diplococcus pneumonia
   c. Staphylococcus epidermidis
   ch. Streptococcus piogenes

d. Sarcina lutea
e. Sipirillum rubrum
f. Escherischia coli
g. Hemophilous influenza
h. Treponema pallidum
i. Vibrio coma
j. Clostridium votulinum

Procedimiento:

1. Observar en 100x.
2. Preparar dibujos a colores de los organismos.
3. Identificar la enfermedad que producen.
4. Mostrar a su instructor (a) el resultado de las observaciones realizadas.

Criterios utilizados en la clasificación de colonias bacterianas

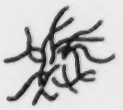
Forma

Circular

Irregular

Huso

Filamentosa



Rizoide

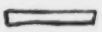
Concéntrica

Circular con el contorno elevado

Forma L

Irregular con proyecciones

Topografía



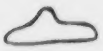
Llana

Elevada

Convexa

Crateriforme

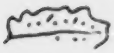
Montañosa



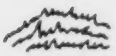
Botón

Contorno

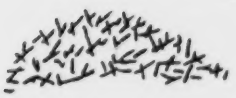
Suave



Ondulada



Rugosa



Filamentosa

Laboratorio núm. 3

Microorganismos en nuestro ambiente

Introducción:

Vivimos en un mundo rodeado de microorganismos, los cuales, por su tamaño tan pequeño, no podemos ver a simple vista. En nuestro propio cuerpo, en el aire que respiramos y en casi cualquier ambiente en que podamos pensar, se encuentran estas formas fabulosas de vida.

El personal de servicios de salud, médicos, enfermeras, técnicos de laboratorio, dietistas, procesadores de alimentos y tantos otros, tienen que estar conscientes de su presencia en todo momento.

Los microorganismos son factores importantes del ecosistema humano. Sus relaciones ecológicas con el hombre y con todas las demás formas de vida son extraordinariamente complejas e importantes. Algunos microorganismos son altamente virulentos y causan la muerte del hombre; otros son vitales en la agricultura y en la industria ya que pueden utilizarse para la confección de productos alimenticios y productos farmacéuticos.

En el aire encontramos un gran número de microorganismos. La colonización de éstos depende de diferentes factores: las personas presentes en el lugar, la cantidad de polvo en el área, la ventilación, y en el caso del ambiente exterior, la contaminación atmosférica y otros factores asociados. A los organismos rutinariamente presentes en este ambiente les llamamos **organismos de aire** (airborne). Por ejemplo, en el ambiente de un hospital hay un gran número de organismos patógenos debido a la cantidad de personas enfermas que frecuentan el mismo. Las enfermedades que en ellos se adquieren se conocen como **nosocomiales**, las cuales son causadas por microorganismos tales como: Staphylococcus aureus y Pseudomona aeroginosa.

Los alimentos, si no se ejerce buen control al manipularlos, son excelentes medios para el desarrollo microbiano. Muchas veces su excesivo crecimiento los contamina, y nos causan enfermedades cuando los ingerimos. El agua, en muchas ocasiones, actúa de reservorio para los microorganismos. Si se contamina con heces fecales, sirve de vehículo para conducir microorganismos de un sitio a otro, con la posibilidad de que al tomarla se adquiera una enfermedad infecciosa. Es de gran utilidad conocer los lugares donde hay posibilidad de que se encuentren microorganismos patógenos para poder ejercer control sobre ellos y prevenir así las enfermedades.

Estamos rodeados de microorganismos. Por suerte, pocos son los verdaderamente peligrosos. Muchos otros son de gran utilidad y sin ellos la vida del hombre no podría existir.

La presencia de microorganismos en diferentes ambientes puede ser demostrada inoculando directamente en un medio de cultivo estéril. También puede hacerse removiendo los microorganismos con un hisopo estéril y luego inoculando en el medio de cultivo adecuado.

Objetivos:

1. Apreciar la distribución y variedad de los microorganismos en el medio ambiente.
2. Conocer la importancia de la presencia de los microorganismos en el ambiente en general.
3. Estar consciente de la importancia del control microbiano en las áreas de trabajo, hogares y otros lugares.

Materiales:

1. Placas de agar nutriente
2. Hisopos estériles individuales
3. Agua destilada
4. Lápices de cera o marcadores indelebles

Equipo a usarse por personal del laboratorio:

1. Contador de colonia con pluma
2. Incubadora
3. Nevera de laboratorio
4. Autoclave
5. Destilador de agua con filtros para la toma de agua

Procedimiento:

1. Utilice una placa de Petri conteniendo agar nutriente, estéril.
2. Utilizando un hisopo estéril, recoja los microorganismos del área asignada. Si extrae la muestra de un área seca, humedezca previamente el hisopo con agua estéril, transpórtelo en el empaque donde viene antes y después de tomar la muestra. Si es de un lugar húmedo, no humedezca el hisopo previamente.
3. Inocule de inmediato su placa de agar después de haber recogido la muestra.
4. Asegúrese de haber identificado su placa bien.
5. Después de inocular, deseche el hisopo en un zafacón regular.
6. Coloque la placa inoculada en forma de estrías en la incubadora, de forma invertida.

*El (la) instructor (a) demostrará el proceso antes de usted realizar el procedimiento.

7. Después de 48 hrs. debe observar su placa en el contador de colonia (Colony counter) y describir sus observaciones comparando las mismas con el diagrama de clasificación y morfología de las colonias bacterianas. Después llenará la tabla de contestaciones donde desglosará la siguiente información: color, consistencia, forma, margen, elevación, y contará las colonias iguales.
8. Repita esta observación con más de cuatro colonias diferentes.

*Cualquier problema consúltelo con su instructor(a) o profesor(a).

Preguntas de repaso:

1. Defina:

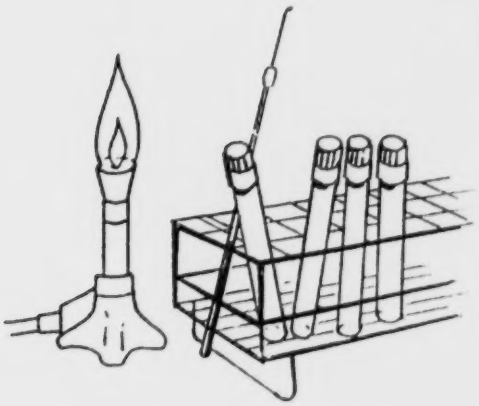
   a. Colonia bacteriana

2. ¿Qué importancia tienen estos procedimientos para los microbiólogos?
3. ¿Qué precauciones se deben tomar al manejar los comestibles?
4. Los microorganismos encontrados en el ambiente, ¿son o no patógenos? Explique.
5. Conteste cierto o falso:

   a. _____ La mayor parte de los cultivos fueron bien pobres en cuanto a crecimiento debido a que este ambiente no es favorable para su desarrollo y crecimiento.

   b. _____ En los alimentos, tales como la leche pasteurizada y el yogurt, no debe haber microorganismos, ya que son productos estériles.

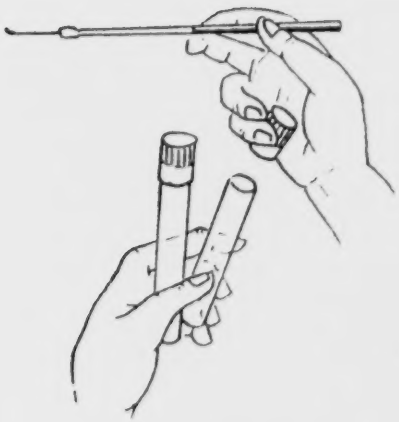
Pasos a seguir en la realización de una transferencia aséptica

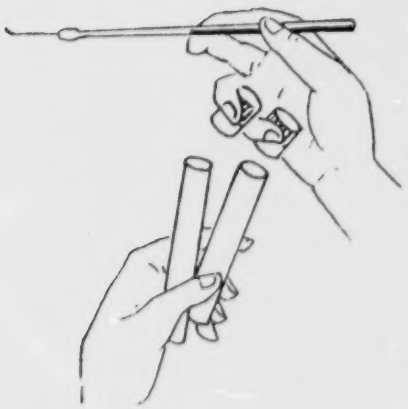


Equipo básico

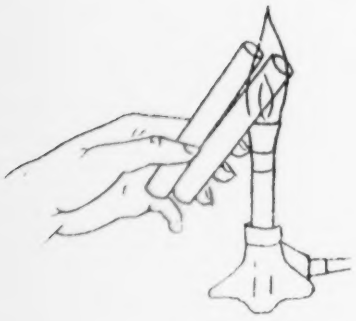
a. Mechero de Bunsen
b. Aguja de inoculación
c. Tubos de cultivo
d. Rack (rejilla)

1. Esterilice la aguja con la flama del mechero de Bunsen.

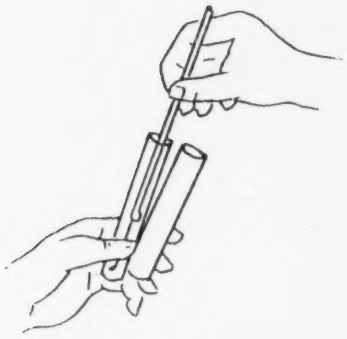




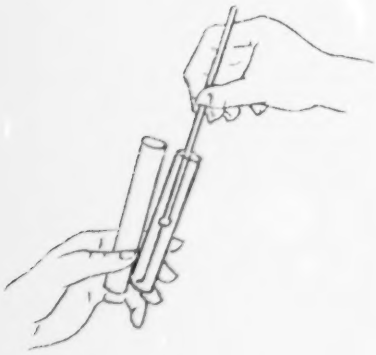
2. Extraiga los tapones de los tubos de cultivo.



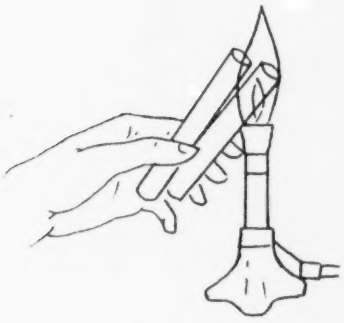
3. Flamee la boquilla de los tubos.



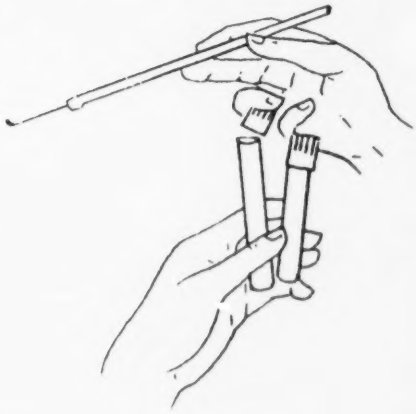
4. Obtenga el inóculo del tubo que contiene las bacterias.



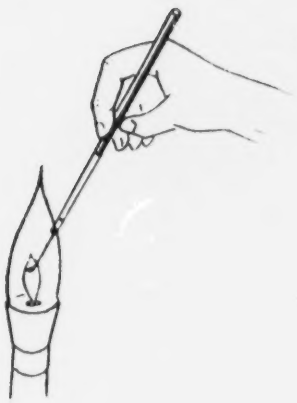
5. Transfiera el inóculo al tubo con el medio de cultivo libre de bacterias.



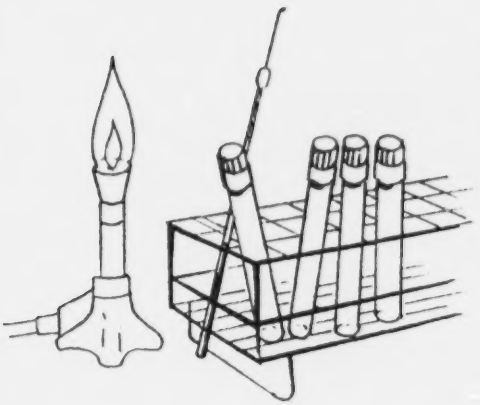
6. Flamee los dos tubos antes de cerrarlos.



7. Recoloque los tapones.



8. Reesterilice la aguja de inocular al terminar el proceso.



9. Coloque todo el equipo en el lugar apropiado.

Laboratorio núm. 4

Tinción simple

Introducción:

El uso del tinte en el estudio de los microorganismos tiene diferentes propósitos. Utilizándolos podemos inhibir el crecimiento de algunos microorganismos. Esto nos ayudará en el control de algunas poblaciones microbianas no deseadas. Además, servirá para estimular el crecimiento de otras.

En el estudio microscópico de los microorganismos, los tintes son de gran utilidad para su identificación. Las células de los microorganismos no tienen color. El citoplasma es transparente, o puede verse de un color grisáceo claro. El uso de tintes es de gran ayuda para identificar los mismos. En el caso de enfermedades infecciosas es necesario identificar el agente causal, para poder establecer un diagnóstico temprano, y tratar al (a la) paciente y establecer medidas preventivas. También puede, luego de identificar el agente causal, desarrollar nuevas técnicas de aislamiento, así como vacunas.

El poder observar e identificar los microorganismos es muy importante. Para poder lograr esta observación, es necesario teñirlos. De esta manera se podrán apreciar las características morfológicas, arreglos especiales o agrupamiento, (las bacterias son tan pequeñas que su tamaño se expresa en micrones (m). Un micrón es igual a una milésima parte de un milímetro y a una diezmilésima parte de un centímetro o a una veinticincomil cuatrocientas partes de una pulgada. La mayoría de las bacterias que se estudiarán miden aproximadamente de uno a tres micrones de largo).

Para lograr el estudio de estos microorganismos y otras formas celulares se utilizan varios métodos o procedimientos. Estos procedimientos se dividen generalmente en dos grandes grupos: las **tinciones simples** y las **tinciones diferenciales.** Las simples conllevan la aplicación de un solo tinte, logrando distinguir nada más que la forma, tamaño y arreglo. Una tinción diferencial utiliza más de un tinte aplicándolo mediante un método específico, logrando observar y discriminar entre formas celulares. Las tinciones se logran utilizando tintes que pueden ser naturales o sintéticos. Los naturales son utilizados mayormente para estudios histológicos, y los sintéticos para bacterias. Estos (sintéticos) son derivados, generalmente, de anilina (carbón y brea) derivada del Benzeno.

Estos tintes son generalmente sales; compuestos que están formados por iones positivos y negativos, que se disocian fácilmente en solución. Por esta razón se pueden dividir en tres grupos : **ácidos, básicos y neutros.** Si el color se encuentra en la carga positiva, tiene características de base; si presenta características negativas es ácido.

Ejemplos:

1. Sal de cloruro de metileno azul
   Azul de metileno$^{(+)}$ + Cloruro$^{(-)}$

2. Sal de eosina sódica
   Eosina$^{(-)}$ + Sodio$^{(+)}$

Otras propiedades químicas de los tintes son las siguientes:

1. Son substancias ácidas (tintes) que se combinan con bases para formar una sal.
2. Son substancias básicas (tintes) que se combinan con ácidos para formar una sal.

Los neutros se forman cuando en una solución combinamos ambas propiedades químicas, colorante ácido y básico.

Resumimos entonces que la tinción en las células se logra al poner en contacto estos tintes (con sus respectivas propiedades) con estructuras de la célula (que tiene sus propiedades) y se combinan química y físicamente entre ellos.

En el próximo laboratorio describiremos un método diferencial.

Objetivos:

1. Aprender el valor del uso de los tintes en el estudio de la morfología y características de las bacterias.
2. Adquirir destrezas en técnicas bacteriológicas básicas.
3. Visualizar las bacterias en el microscopio utilizando el objetivo de inmersión en aceite.
4. Conocer la utilización de este método de tinción.
5. Aprender a realizar un extendido o frotis utilizando un cultivo en un medio líquido o un cultivo en un medio sólido.
6. Aprender a utilizar correctamente el mechero.

Materiales:

1. Cultivos puros de 24 horas en agar inclinado y caldo de:

   a. Bacillus subtillis
   b. Escherischia coli

c. Staphylococcus epidermidis
d. Proteus vulgaris

2. Tinte azul de metileno en botella con goteros individuales
3. Agujas de inocular: rectas y espirales
4. Aceite de inmersión
5. Libretas de papel bibuloso
6. Papel de lente
7. Lápiz de cera
8. Microscopios binoculares
9. Pinches de madera (de tender ropa)
10. Mecheros
11. Encendedores electrónicos (spark lighter)
12. Papel absorbente (Kimwipes paper)
13. Papel extra absorbente (Kaydry paper)
14. Agua destilada
15. Laminillas limpias
16. Solucion jabonosa de "Povoiodine" (Povoiodine Scrub Solution)

Procedimiento:

A. Preparación de extendido de un cultivo en caldo

1. Rotule las laminillas a usarse con lápiz de cera, a un lado donde no haya contacto con el tinte.
2. Esterilice su aguja de inocular, utilizando el mechero, mediante el proceso de incineración.
3. Deje enfriar levemente dicha aguja.
4. Desenrosque la tapa del tubo de cultivo que contiene bacterias, utilizando el dedo pequeño.
5. Queme la boca del tubo , pasándola por la llama del mechero.
6. Introduzca la aguja de inocular. Esta tiene que estar estéril y fría. Cuidadosamente, tome una muestra del cultivo.
7. Coloque la gota sobre la laminilla y esparza en forma circular.
8. Deje secar al aire, brevemente.
9. Fije las bacterias a la laminilla pasando la misma por la llama del mechero, repita este paso tres veces. No sobrecaliente la laminilla ya que se puede romper.
10. Proceda a la tinción correspondiente.
11. Repita este procedimiento cuantas veces le corresponda preparar una tinción positiva.

B. Preparación de un extendido (frotis) de un medio sólido

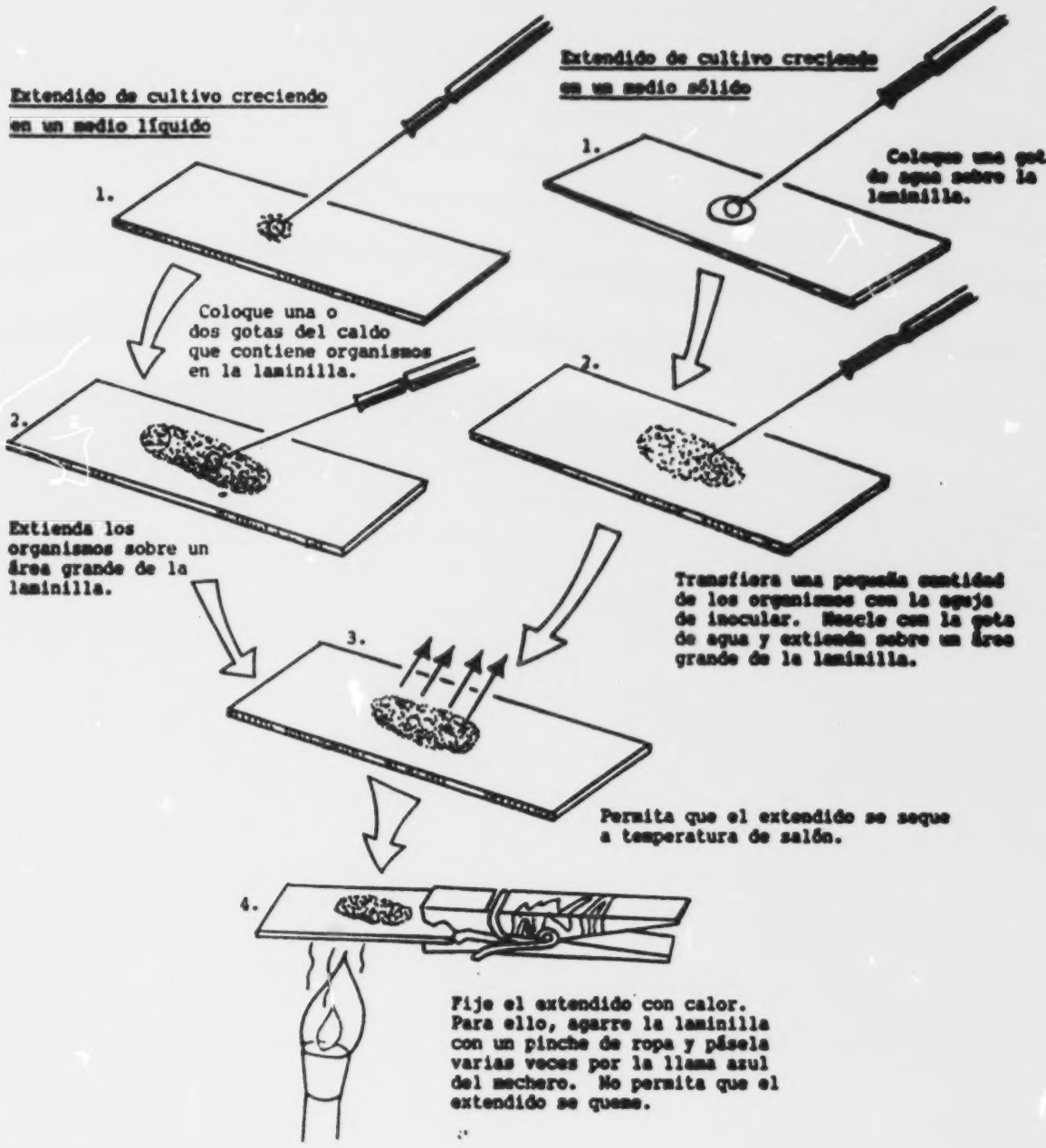
1. Tome una laminilla limpia y deposite una gota de agua, usando una aguja de inocular con espiral.
2. Con la aguja de inocular inclinada toque (utilizando una aguja de inocular recta) el cultivo bacteriano. Extraiga poca muestra, sin romper el agar.
3. Mezcle la muestra con la gota de agua obtenida previamente, y esparza circularmente.

*Lleve a cabo los pasos del procedimiento anterior, pero en esta ocasión con mucho cuidado.

C. Aplicación de la tinción

1. Coloque la laminilla con el frotis hacia arriba en el soporte para fregadero o (Staining rack).
2. Añada el tinte indicado sobre toda el área de la muestra o frotis.
3. Deje en contacto la muestra con el tinte por un minuto.
4. Enjuague la muestra cuidadosamente con agua de la pluma (sin que el flujo del agua golpee la muestra) hasta que el exceso de tinte salga completamente.
5. Deje secar al aire unos instantes y elimine el exceso de agua utilizando papel bibuloso. Ponga en contacto el papel con la laminilla sin frotarlos. Tenga mucho cuidado, puede perder la muestra.
6. Proceda a observar en el microscopio, utilizando correctamente el procedimiento de observación microscópica enseñado en el laboratorio #1. Utilice el objetivo de 100x (inmersión en aceite).
7. Examine su laminilla en detalle. Prepare dibujos usando lápices de colores. Identifique bien sus observaciones.

Preparación de un extendido bacteriano


Extendido de cultivo creciendo en un medio líquido
1.
Coloque una o dos gotas del caldo que contiene organismos en la laminilla.
2.
Extienda los organismos sobre un área grande de la laminilla.
3.
4.
Extendido de cultivo creciendo en un medio sólido
1.
Coloque una gota de agua sobre la laminilla.
2.
Transfiera una pequeña cantidad de los organismos con la aguja de inocular. Mezcle con la gota de agua y extienda sobre un área grande de la laminilla.
Permita que el extendido se seque a temperatura de salón.
Fije el extendido con calor. Para ello, agarre la laminilla con un pinche de ropa y pásela varias veces por la llama azul del mechero. No permita que el extendido se queme.

Laboratorio núm. 5

Tinción Gram

Introducción:

Entre las tinciones positivas, que son aquellas que tiñen estructuras celulares, se encuentran las diferenciales. Estas conllevan la aplicación de más de un tinte. La **tinción Gram** es es una diferencial, cuyo método fue descubierto por un médico danés en 1884, el Dr. Gram. En honor a él se conoce el método de tinción diferencial como la tinción Gram.

Mediante este método se utilizan dos tintes diferentes en secuencia. De acuerdo con la reacción que produzcan con la estructura celular correspondiente, éste va a retener uno de los dos tintes. Esta reacción es la que permite diferenciar entre organismos Gram positivos o Gram negativos. La estructura celular que retenga el tinte primario se va a clasificar Gram positivo y el que retenga el contratinte se clasificará Gram negativo.

Como vemos, las tinciones diferenciales nos permiten discriminar entre organismos, todo esto sujeto a las propiedades intrínsecas de las estructuras celulares y la de los tintes.

El mecanismo de acción entre estructuras celulares y tintes todavía no está claro, pero se entiende que en organismos bacterianos la composición química de la pared celular es vital en la aceptación del tinte.

Se ha observado que los organismos Gram positivos presentan en su pared celular mayor cantidad de una molécula compleja llamada **peptigoglicón**; y que los Gram negativos tienen más lípidos que los Gram positivos.

El método de Gram utiliza una solución fijadora del tinte y una decolorante. Estos son el Iodo de Luggol's y el alcohol al 95%. El iodo pretende provocar una molécula insoluble con el tinte primario para que cuando se le añada el decolorante (alcohol) no se escape el tinte, pero como el alcohol no sólo puede jugar químicamente con los tintes sino también con la pared celular de la bacteria, puede eliminar el tinte con el iodo atado al componente celular o deshidratar las estructuras orgánicas y de esta manera eliminar el tinte.

La secuencia del método de Gram es la siguiente:

1. Aplicar el tinte primario
2. Aplicar solución mordente
3. Aplicar decolorante
4. Aplicar contratinte

Objetivos:

1. Describir el método de Gram.
2. Aprender a discriminar entre organismos Gram (+) y Gram (-).
3. Practicar la preparación del frotis.
4. Practicar la tinción Gram.
5. Practicar la utilización del objetivo de 100x.
6. Entender cómo funciona la tinción Gram al utilizarse en bacterias.

Materiales:

1. Microscopios binoculares
2. Aceite de inmersión
3. Libretas de papel bibuloso
4. Papel de lente
5. Papel absorbente (Kimwipes)
6. Lápiz de cera
7. Laminillas limpias
8. Agujas de inocular: rectas y con espiral
9. Pinches de madera
10. Mecheros
11. Encendedores electrónicos (spark lighters)
12. Papel extra absorbente (Kay dry paper)
13. Solución jabonosa de Povoidine (Povoiodine Scrub Solution)
14. Agua destilada
15. Tinte cristal violeta
16. Tinte safranina
17. Alcohol al 95%
18. Acetona
19. Iodo de Luggol's
20. Conjunto de colorantes de Gram (Kit de Gram)
21. Cultivos en agar inclinado y caldo de no más de 24 horas de:

    a. Bacillus aereus
    b. Escherischia coli
    c. Staphylococcus aureus
    ch. Pseudomona aeroginosa
    d. Bacillus subtillis
    e. Proteus vulgaris
    f. Staphylococcus epidermidis
    g. Enterobacter cloacae

Procedimiento:

A. Preparación del frotis:

1. Realizar los mismos procedimientos señalados en el ejercicio anterior.

B. Aplicación del método de Gram:

1. Coloque su laminilla en un soporte para tinción, después de haber preparado el frotis, con la muestra hacia usted.
2. Añada el tinte primario, cristal violeta, sobre el esparcido de su laminilla, y deje por un minuto.
3. Enjuague con agua de la pluma, para retirar el exceso de tinte.
4. Añada la solución mordente, Iodo de Luggol's, por un minuto.
5. Enjuague con agua de la pluma para retirar el exceso.
6. Añada la solución decolorante, alcohol y acetona, por 20 segundos.
7. Enjuague la laminilla al cabo del tiempo indicado anteriormente.
8. Añada el contratinte, safranina, sobre la muestra, y deje por 30 segundos.
9. Enjuague con agua de la pluma, para eliminar el exceso.
10. Deje secar la laminilla varios segundos.
11. Elimine el agua que quede secando la muestra con papel bibuloso.
12. Proceda a observar en el microscopio con el objetivo de 100x (inmersión en aceite).
13. Prepare dibujos e identifique lo que observó. Clasifique en Gram (+) o Gram (-).

Laboratorio núm. 6

Tinciones negativas

A. Tinción de cápsula por el método de Gin

Introducción:

Entre los procedimientos de tinciones conocidos hay unos en los que por la naturaleza de las propiedades bioquímicas de los microorganismos y sus estructuras, no nos permiten teñirlos. Para poder lograr una observación sólo podemos mezclar el microorganismo con un tinte o agente opaco para intentar teñir el medio (la laminilla) y por contrastes, desviación de la luz, utilización de un contratinte y sombras, poder observar el organismo. A estas tinciones en la que no está envuelto el aplicarle calor al organismo o a sus partes, se les conocen como **tinciones negativas.**

En los ciclos de vida de algunas especies de microorganismos podemos encontrar que éstos pueden fabricar una cubierta externa mucilaginosa o viscosa que le confiere impermeabilidad y mayor resistencia al medio donde esté. Esta cubierta se le conoce como **cápsula.** La cápsula aisla bioquímicamente al organismo del medio ambiente, y evita que entre en contacto nada del medio ambiente hacia ellos. Por esta razón, para notar la presencia y poder identificarlos, se utiliza una tinción especial, ya que con otro método de tinción no lograríamos nada.

Una bacteria que produce cápsula presenta una capacidad mayor de virulencia. Es mucho más patógena y difícil de combatir. Enfermedades tales como pneumonias, meningitis y otras, son causadas por estos organismos (bacterianos y hongos unicelulares) y las mismas pueden ser difíciles para controlar.

Objetivos:

1. Aprender la técnica para la preparación de la tinción negativa.
2. Poder visualizar la estructura especial llamada cápsula.
3. Entender el concepto de alta virulencia.
4. Identificar especies que pueden producir cápsulas, tanto bacterias como hongos.
5. Discutir cómo esta tinción puede ser considerada una diferencial.

Materiales:

1. Laminillas limpias
2. Aguja de inocular recta
3. Tinte negrosina o tinta china
4. Papel de lente
5. Papel absorbente (Kimwipes)
6. Papel extra absorbente (Kay dry paper)
7. Mecheros
8. Gradillas de madera
9. Bolsas de autoclave (Bench-size)
10. Sostenedor mecánico para bolsas de autoclave (Bench-size)
11. Solución jabonosa Povoiodine (Povoiodine Scrub Solution)
12. Encendedores electrónicos (spark lighter)
13. Agua destilada
14. Cultivos de bacterias en agar inclinado de 18 a 24 horas de:

    a. Criptococcus neoformans
    b. Kleibsella pneumoniae
    c. Staphylococcus epidermidis

15. Azul de metileno de Loffler's

Procedimiento:

1. Tome una laminilla limpia y coloque con un gotero una gota de tinte nigrosina.
2. Incinere bien una aguja de inocular y luego realice una transferencia aséptica de un cultivo puro en agar sólido, y extraiga una muestra pequeña de microorganismos.
3. Mezcle el inóculo con la gota de tinta y esparza por la laminilla.
4. Deje secar bien al aire.
5. Cuando esté seco, añada una gota de azul de metileno de Loffler's y exponga por 3 minutos.
6. Al cabo del tiempo, lave suavemente con agua de la pluma.
7. Deje secar al aire completamente.
8. Observe en el objetivo de 100x.
9. Prepare dibujos e idéntifique lo observado.
10. Deseche su laminilla al final en la bolsa para autoclave.

Laboratorio núm. 7

Tinciones especiales

A. Tinción de endoesporas bacterianas

Introducción:

Algunas especies de microorganismos presentan una serie de etapas dentro de su ciclo de vida. Entre éstas, se encuentran las que desarrollan estructuras internas para almacenar sus características genéticas llamadas **esporas.** Estas esporas son unas estructuras mucilaginosas que resisten cambios drásticos del medio ambiente como altas temperaturas, presión y acidez. Como hemos mencionado, estas esporas son muy resistentes; cuando el microorganismo se siente afectado, encuentra poca disponibilidad de nutrimentos o encuentra el medio hostil para su vida, desarrolla estas estructuras.

Las esporas, al ser desarrolladas dentro de la estructura normal de la bacteria, localizada en el interior, se conocen como **endoesporas.** La etapa de bacteria se conoce como etapa vegetativa. Este ciclo de etapa vegetativa-espora y viceversa se observa en bacterias de los géneros de Bacillus y Clostridium, generalmente.

Las endoesporas son estructuras que no se pueden teñir por métodos ordinarios, por lop tanto, estudiaremos un procedimiento combinado de tinción utilizando el método de Schaeffer-Fulton.

Objetivos:

1. Reconocer en el microscopio estructuras especiales.
2. Aprender el método de tinción para endoesporas bacterianas.
3. Conocer los géneros bacterianos que producen esporas.
4. Entender el ciclo de vida de algunos géneros de bacterias y la resistencia que le confiere a las especies.

Materiales:

1. Microscopios binoculares
2. Papel de lente
3. Papel absorbente (Kimwipes)
4. Papel extra absorbente (Kay dry)
5. Laminillas limpias
6. Mecheros
7. Encendedor electrónico (spark lighter)

8. Lápiz de cera
9. Agujas de inocular: rectas y con espiral
10. Base
11. Anillo
12. Malla de calentar
13. Agua destilada
14. Beaker o vaso de precipitado de 250ml.
15. Tinte verde de malaquita
16. Goteros
17. Tinte safranina
18. Papel bibuloso
19. Cultivo puro en agar inclinado (24 a 36 horas) de:

    a. Bacillus megaterium

20. Plataforma de teñir
21. Plato de calentar (Hot plate)

Procedimiento:

1. Tome una laminilla limpia y prepare un frotis con el microorganismo descrito.
2. Cubra su frotis con verde de malaquita y colóquelo sobre un vaso de precipitado que tenga agua hirviendo. Manténgalo así por cinco minutos y continúe sustituyendo el tinte durante el transcurso del tiempo señalado. Evite que se seque durante el procedimiento.
3. Deje enfriar bien, luego lave por 30 segundos.
4. Añada el tinte safranina y mantenga en contacto por 20 segundos.
5. Lave con agua corriente para remover el exceso de tinte.
6. Seque con papel bibuloso.
7. Observe por el microscopio. Prepare dibujos.

Debe observar las esporas color verde y la parte vegetativa de la bacteria color rosado.

Laboratorio núm. 8

Gota pendiente

Introducción:

Existen varias especies bacterianas que pueden desplazarse libremente en medios acuosos, en virtud del movimiento que les confieren apéndices de locomoción conocidos como **flagelos.** Estos apéndices están formados por ligamentos de naturaleza protéica, anclados a la estructura celular a través de gránulos basales. Los flagelos dotan de motilidad a la célula bacteriana a base de movimientos ondulatorios en medios o ambientes acuosos. En medios sólidos, la mayoría de éstas pierden su motilidad, dado que el movimiento ondulatorio se va a reducir al mínimo. Existen excepciones a esta generalización, como sucede al observar especies del género Proteus; Proteus vulgaris y Proteus mirabilis. Éstos son organismos que en medios sólidos con una superficie ligeramente húmeda, exhiben un crecimiento en forma de olas (swarming) o regado, demostrando un desplazamiento en el medio.

El estudio de la capacidad de una célula para exhibir motilidad, constituye un criterio taxonómico muy útil en la clasificación de las bacterias como móviles o no móviles. Se deben tomar en consideración los factores que regulan dicho fenómeno en bacterias. La capacidad de una célula bacteriana para generar flagelos está determinada genéticamente. No obstante, la presencia o ausencia de flagelos en un momento dado, en una célula bacteriana clasificada como móvil, está determinada por factores ajenos al genotipo de la bacteria. Ello implica que una bacteria puede tener la capacidad genética para desarrollar flagelos, más sin embargo, diversos factores fuera del control genético de la motilidad, tales como la edad del cultivo, el medio nutricional donde se han cultivado los microorganismos y la presencia de substancias que inhiben la regeneración de flagelos, controlan la actividad de la maquinaria biosintética de la célula. De esta forma, la síntesis de los componentes del flagelo, y por ende la motilidad de la célula bacteriana, están supeditadas a los factores ya mencionados.

La detección de motilidad en bacterias puede efectuarse por métodos directos como la prueba de gota colgante y la prueba de motilidad en agar semisólido. La motilidad bacteriana puede ser también estudiada por métodos indirectos, como la observación microscópica de los flagelos debidamente teñidos.

Cuando detectamos la motilidad en forma directa, mediante la observación microscópica de una suspensión bacteriana, debemos distinguir entre movimiento verdadero y movimiento Browniano. El movimiento verdadero de una célula bacteriana lo describiremos como un desplazamiento progresivo a

través del campo de visión del microscopio. En otras palabras, se observa un desplazamiento de un lugar a otro al azar. Por otro lado, el movimiento Browniano se describe como vibración u oscilación de las células, manteniéndose en un mismo lugar. Ese movimiento vibratorio es producto del impacto de las moléculas de una suspensión, sobre el cuerpo de las bacterias.

Objetivos:

1. Reconocer la importancia y utilidad de la detección de motilidad en la bacteria.
2. Aprender y adquirir destrezas en las técnicas de detección de motilidad en las bacterias.

Materiales:

1. Microscopio binocular
2. Papel absorbente (Kimwipes)
3. Papel de lentes
4. Papel extra absorbente (Kay dry)
5. Mecheros
6. Encendedores electrónicos (Spark lighter)
7. Agujas de inocular: rectas y con espiral
8. Laminillas cóncavas
9. Cubreobjetos
10. Glicerina
11. Palillos de dientes o aplicadores de vidrio
12. Vaso de precipitado o beaker de 250ml.
13. Solución desinfectante
14. Cultivos en caldo o agar inclinado de (24 hrs.):

    a. Proteus mirabilis
    b. Sarcina lutea

15. Gradillas

Procedimiento:

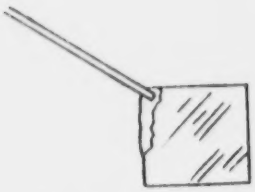
1. Impregne una gota de glicerina en los cuatro extremos de un cubre objetos.
2. Mediante una transferencia aséptica extraiga una muestra de cultivo en caldo y coloque en la parte media del cubreobjeto.
3. Tome una laminilla con depresión cóncava (limpia) y colóquela sobre el cubreobjetos (con la depresión cóncava hacia la gota), de tal manera que pueda ver la gota a través de la depresión. Observe que la glicerina entre en contacto con la laminilla de tal manera que se adhiera a la misma.

4. Tome su laminilla por los extremos y mediante un giro rápido colóquela con el cubreobjetos de cara a usted.
5. Monte su laminilla en el microscopio y observe su muestra utilizando el objetivo de 40x.

   *Tenga cuidado al acercar el objetivo a la muestra, ya que la laminilla utilizada en este procedimiento es mucho más gruesa que las demás.

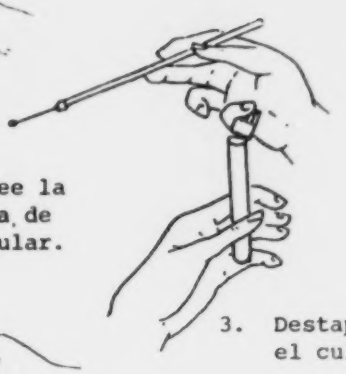
6. Observe y determine el tipo de movimiento. Clasifíquelo en mótil y no mótil.

Preparación de la técnica de la gota colgante

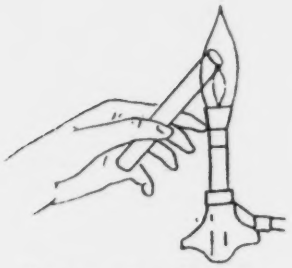


1. Aplique glicerina en los extremos del cubreobjetos.

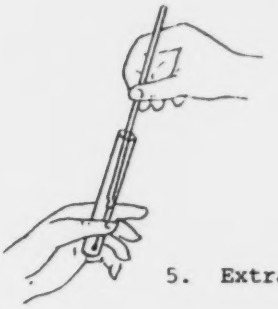
2. Flamee la aguja de inocular.



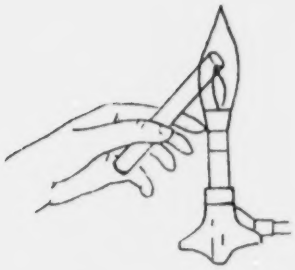
3. Destape el cultivo.



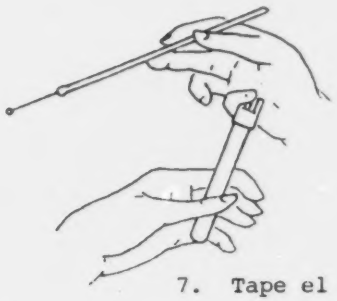
4. Flamee el tubo de cultivo.



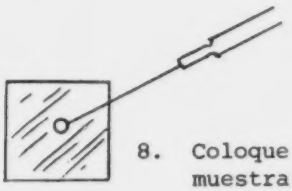
5. Extraiga la muestra.



6. Flamee el tubo.

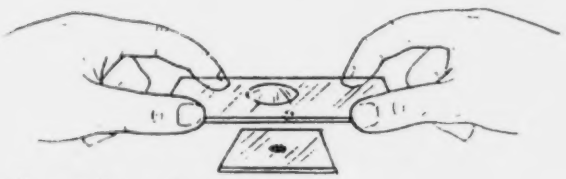


7. Tape el tubo.



8. Coloque la muestra en el medio del cubreobjetos.

10. Vire la laminilla con el cubreobjetos adheridos.



9. Deposite sobre el cubreobjetos la laminilla cóncava (con el cóncavo hacia la muestra).

Laboratorio núm. 9

Prueba de motilidad en agar semisólido

Objetivos:

1. Reconocer la importancia de este método para determinar motilidad.

2. Aprender otra destreza para la determinación de motilidad bacteriana.

Materiales:

1. Cultivo en caldo de 24 horas de:

   a. *Proteus mirabilis*
   b. *Sarcina lutea*

2. Aguja de inocular recta
3. Tubos de agar inclinado profundos para la determinación de motilidad (Motility Test Medium)
4. Mecheros
5. Lápices de cera
6. Gradillas

Procedimiento:

1. Mediante una transferencia aséptica retire un inóculo de microorganismos utilizando una aguja recta.

2. Introduzca dicha aguja hasta lo profundo del agar inclinado y esparza dicho inóculo en el fondo.

3. Rotule adecuadamente.

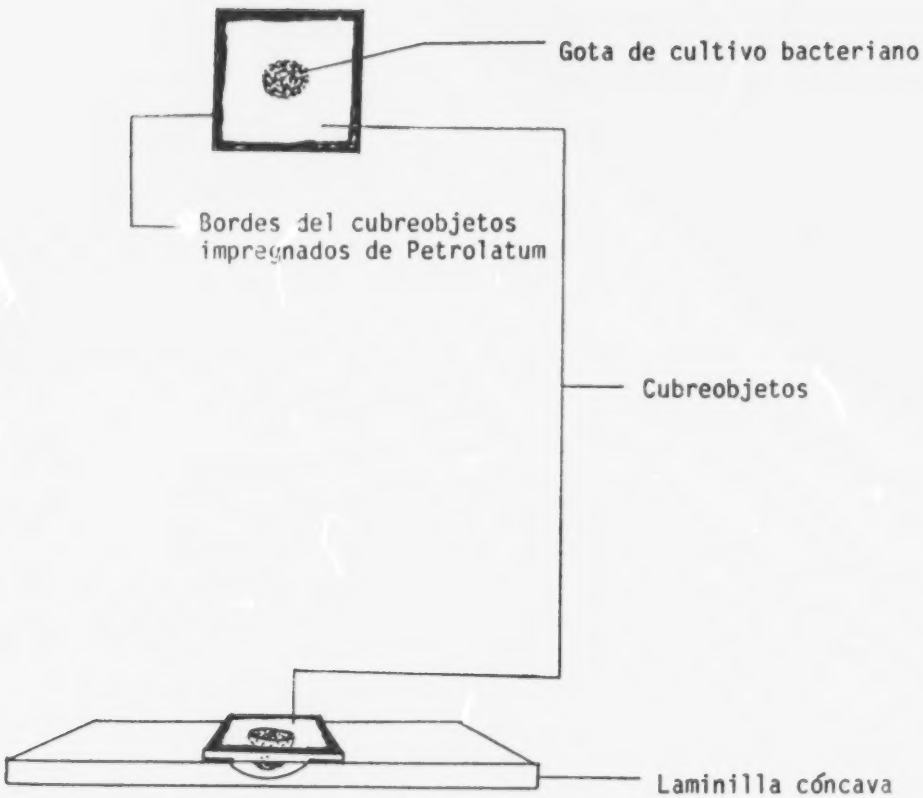
4. Incube la muestra a 35°C por espacio de 24 a 48 horas.

5. Examine su tubo para determinar esparcimiento de las colonias crecidas sobre el agar.

6. Prepare diagramas de lo observado.

Técnica de gota colgante

para detectar motilidad



Laboratorio núm. 10

Características fisiológicas bacterianas

Introducción

Los criterios taxonómicos más importantes en la identificación de bacterias están basados en las propiedades fisiológicas o bioquímicas que exhiben. En raras ocasiones, es posible lograr la identificación del género a que pertenece una bacteria, utilizando como único criterio taxonómico los rasgos morfológicos y las características de cultivo que identifican al microorganismo. Aún en los casos en que fuera posible hacerlo, la determinación final sobre la especie a que pertenece una bacteria necesariamente dependerá del conocimiento que obtengamos sobre las actividades bioquímicas que realice dicho organismo. En algunos casos se requiere la utilización de pruebas inmunológicas y técnicas especiales como la fagotipia para lograr una identificación o clasificación exacta de un espécimen bacteriano.

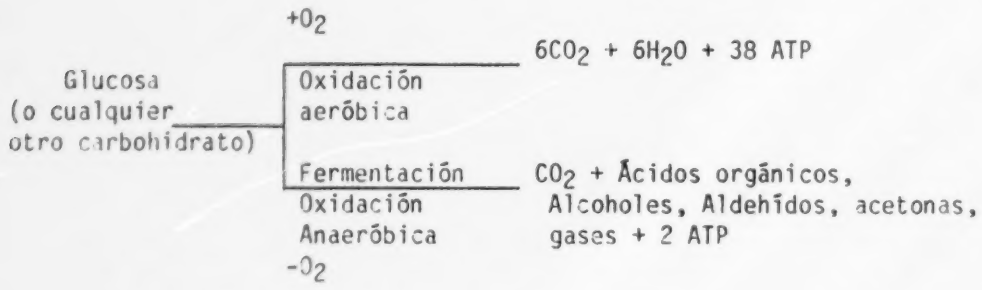
Un estudio completo de las propiedades bioquímicas de un microorganismo es una tarea laboriosa y extensa. En un curso introductorio como el nuestro, nos limitaremos al estudio de algunas características fisiológicas básicas relacionadas con la tipificación de bacterias. Debemos considerar que al estudiar las características fisiológicas de un organismo, básicamente estudiamos las reacciones químicas que componen el metabolismo de dicha entidad. Por un lado, tenemos las reacciones de biodegradación que le permiten e una célula obtener energía de la oxidación y reducción de los nutrientes que asimila del ambiente. Del otro lado, tenemos las reacciones de biosíntesis que le permiten a una célula formar las moléculas que necesitan para mantener su integridad estructural y funcional. El metabolismo celular lo podemos estudiar, entonces, a través de la detección de los productos que se acumulan en dichas reacciones o midiendo los niveles de las enzimas que catalizan las mismas. Debemos recordar que las enzimas son macromoléculas de naturaleza protéica que funcionan como agentes catalíticos de las reacciones químicas que se observan en los organismos vivientes. En su función de catalizadores, las enzimas aceleran la velocidad de las reacciones químicas en que participan, pero sin formar parte del producto final.

A. Digestión de carbohidratos: (Fermentación y respiración)

Un punto básico para iniciar el estudio de las características fisiológicas de un microorganismo, lo constituye el determinar si dicho organismo utiliza las vías metabólicas propias de una fermentación para obtener energía de los nutrientes que ingiere, o si, por el contrario, oxida aeróbicamente los mismos. Recordemos que los carbohidratos constituyen la fuente de energía más abundante y la más provechosa

en términos de la energía que se obtiene de su biodegradación. De esta forma, un análisis de la digestión de carbohidratos nos permite estudiar las características fisiológicas básicas de una bacteria.

A continuación veremos un diagrama donde se muestran las vías de biodegradación más simples que puede tomar un organismo heterotrófico, en presencia y en ausencia de oxígeno.



Como observamos, el metabolismo aeróbico de glucosa, resulta en la oxidación total de dicha molécula. Por otro lado, en el metabolismo anaeróbico de glucosa se generan productos parcialmente oxidados, principalmente ácidos orgánicos. Tomando en consideración los productos generados a través de ambas rutas metabólicas, podemos identificar las mismas, midiéndole el pH del medio de cultivo donde crece el organismo. En el caso de que el microorganismo a estudiarse sea uno que utilice la vía de oxidación aeróbica, el pH del medio de cultivo se mantendrá cerca de la región neutral o ligeramente básico. Por otro lado, si el organismo utiliza la vía fermentativa, se generan en la misma productos orgánicos que acidifican o bajan el pH del medio de cultivo.

Para medir cambios en el pH del medio de cultivo, se utiliza un indicador de ácido-base. Dicha substancia es, en este caso, un tinte orgánico que cambia de color dependiendo del cambio que se registre en la concentración de iones de hidrógeno en el medio de cultivo.

En el ejercicio que realizaremos, se utilizará rojo fenol como indicador ácido-base. Dicho indicador exhibe un color rojo a partir de un pH de 6.8 hasta 8.4 (variaciones del pH). Cuando el pH baja de 6.8 el indicador irá cambiando de color hasta adquirir un color amarillo. En caso de producirse gas por fermentación se puede observar rompimiento del agar. Si utilizamos un medio líquido, se introduce previamente un tubo Durham el cual se llenará del gas si éste se produce como producto de la fermentación.

La prueba de catalaza es otra que se utiliza para determinar la fermentación de azúcares, cuyo producto final es la obtención de peróxido. Para esto se utiliza un medio de cultivo constituido por tres tipos de azúcares diferentes al que se le ha añadido un indicador de pH.

B. **Hidrólisis de proteínas**

Algunas bacterias tienen la capacidad de utilizar las proteínas como fuentes de carbono, nitrógeno e inclusive, energía. Esto sucede en etapas y en una conversión secuencial de macromoléculas hasta degradarlas en unidades funcionales y obtener aminoácidos simples. Para esto la bacteria debe sintetizar enzimas hidrolíticas que faciliten la degradación de estas moléculas complejas.

Objetivos

1. Reconocer la importancia y utilidad de varias pruebas bioquímicas como criterios taxonómicos en la clasificación de bacterias.
2. Obtener un conocimiento más claro del rol que desempeñan las enzimas en el metabolismo bacteriano.
3. Conocer las principales vías metabólicas para la digestión de carbohidratos en presencia y ausencia de oxígeno.

Materiales

1. Tubos de fermentación de carbohidratos, dextrosa y lactosa
2. Agar férrico con azúcar triple (Triple Sugar Iron Agar)
3. Agujas de inocular rectas y con espiral
4. Cultivos en caldo de 24 horas de:

   a. Pseudomona aeroginosa
   b. Escherischia coli
   c. Basillus subtillis
   ch. Proteus mirabilis
   d. Sarcina lutea
   e. Enterobacter aerogenes

Procedimiento

1. Inocule uno de cada tipo de tubo de fermentación con microorganismos.
2. Incube por 24 a 48 horas a 35°C
3. Examine y prepare una tabla con las reacciones observadas en los tubos. Con un signo (+) se describirán los tubos que sufrieron cambios y con un signo (-) los que no sufrieron cambios.

Laboratorio núm. 11

Medios de cultivo

Introducción

Para poder realizar cualquier estudio de bacterias, debemos, primeramente, retirarlas de su ambiente natural y ponerlas a crecer en un medio parecido a su ambiente común. Para poder cultivar los microorganismos es necesario tener conocimiento de su fisiología. Es importante conocer cuáles son los requerimientos nutricionales y cómo es su metabolismo. De esta manera se puede preparar un medio adecuado para lograr un crecimiento óptimo de los mismos.

Dicho crecimiento está sujeto a siete factores significativos. El medio debe:

1. Contener los elementos nutritivos necesarios.
2. Disponer de la cantidad necesaria de O_2.
3. Tener regulada la humedad.
4. Tener regulada la acidez del medio (pH).
5. Tener regulada la temperatura ideal.
6. Estar libre de cualquier otra fuente de vida (estéril).
7. Evitar que se contamine el cultivo.

En el laboratorio se puede utilizar una diversidad de substancias que sirven para estimular el crecimiento bacteriano, de tal forma que este crecimiento sea visible y abundante.

Un medio de cultivo debe proveer al microorganismo de las siguientes fuentes nutritivas indispensables:

1. Carbón
2. Nitrógeno
3. Sales orgánicas
4. Vitaminas u otras substancias que ayuden a su crecimiento como extractos de tejido vegetal o animal.

Dependiendo de la composición del medio de cultivo, se va a llamar y a diferenciar uno del otro. Debemos recalcar que estos medios son preparados primero en soluciones (líquidos). Si se quiere utilizar o cambiar la consistencia del medio de cultivo, se le añade una substancia o agente solidificante que puede ser: gelatina, albúmina o agar. Este último es un derivado de las algas rojas que permite, favorablemente, la solidificación de un medio (al mezclarse) a unas temperaturas ambientales y que no se licúa hasta por lo menos 60°C de temperatura (25-60°C). Este grado de temperatura

permite cultivar organismos e incubarlos a diferentes temperaturas sin que este medio semisólido altere su composición. Un detalle importante es que esta substancia de tipo polisacárida no es degradable por los microorganismos, por lo tanto no es una substancia nutritiva para ellos.

Un medio de cultivo común es aquella serie de ingredientes conocidos que representan los requerimientos básicos necesarios para la vida de los microorganismos. Como en cualesquiera de otras especies de organismos, hay algunos que necesitan variaciones específicas de nutrientes y no pueden sobrevivir en un medio común. A estos organismos se les conoce como **fastidiosos**. Para éstos existe otro tipo de medio de cultivo, llamado enriquecido, al cual se le han añadido (al medio común) extractos de tejido vegetal o animal. También conocemos medios en los que se le añaden tintes indicadores de actividades metabólicas o substancias con el poder de inhibir el crecimiento de algunas especies selectivamente. A este medio se le llama selectivo. Para discriminar entre especies creciendo juntas en un mismo medio, se le añade al medio común, combinaciones de tintes, extractos, etc.; de esta manera observaremos diferentes organismos creciendo en un mismo medio siendo discriminados por la reacción química o metabólica producida por los mismos. A estos medios se le conoce como diferenciales.

El desarrollo de métodos para crecer bacterias en cultivos puros ha sido uno de los adelantos más importantes en las técnicas microbiológicas.

Se entiende por cultivo puro aquel que sólo contiene una bacteria o un sólo microorganismo. Los trabajos de Robert Koch fueron fundamentales en este desarrollo. Los postulados de Koch señalan la necesidad de cultivar los microorganismos como un paso necesario para demostrar que un organismo es el causante de una enfermedad. La bacteriología moderna se basa, entre otras cosas, en el desarrollo y mantenimiento del crecimiento de las bacterias.

Para esta demostración utilizaremos medios de cultivos enriquecidos y diferenciales para el cultivo de bacterias entéricas.

Dentro de las bacterias entéricas hay unas que utilizan la sangre como fuente alimenticia. Estas se conocen como bacterias hemofílicas ya que degradan el contenido de la sangre. Dentro de las bacterias hemofílicas encontramos los staphylococos y los estreptococos, que producen variaciones en los tipos de hemólisis. Los que decoloran al agar sangre (medio enriquecido y diferencial) se conocen como **Beta hemofílicos**, los que tornan verdoso el agar sangre se conocen como **Alfa hemofílicos**, y los que no cambian el color del medio son los **Gamma hemofílicos**. Esta variedad de tonalidades se debe a la producción de una enzima bacteriana llamada **hemolisina**, que permite degradar componentes de la pigmentación sanguínea como son las moléculas de hemoglobina.

Tipos de hemólisis

a b

a. Tipo de hemólisis de Estreptococos

b. Tipo de hemólisis de Estaphylococos

El agar sangre es un medio enriquecido que nos permite determinar si la bacteria ha producido la enzima **hemolicina.** Cuando el resultado de hemólisis (entendiendo por **hemólisis** que es la producción de enzimas) es parcial, se dice que es **alpha hemólisis,** si es hemólisis completa, **beta hemólisis** y de no ocurrir ningún cambio alrededor de la colonia, se dice entonces que es **gamma hemólisis** o **no hemolítico.**

Realizando técnicas para aislar colonias, se puede preparar este tipo de pruebas para lograr observar el crecimiento de colonias aisladas y verificar si produce o no hemolisina.

Objetivos

1. Explicar la importancia del cultivo bacteriano en el estudio de los microorganismos.
2. Conocer las características que hay que tomar en consideración al cultivar microorganismos en un medio.
3. Desarrollar destrezas en el uso de técnicas de inoculación de bacterias.
4. Obtener cultivos puros de mixtos utilizando la técnica de placa estriada.
5. Conocer los diferentes tipos de medios de cultivo.
6. Identificar organismos patógenos de la garganta.
7. Describir los diferentes tipos de hemólisis.

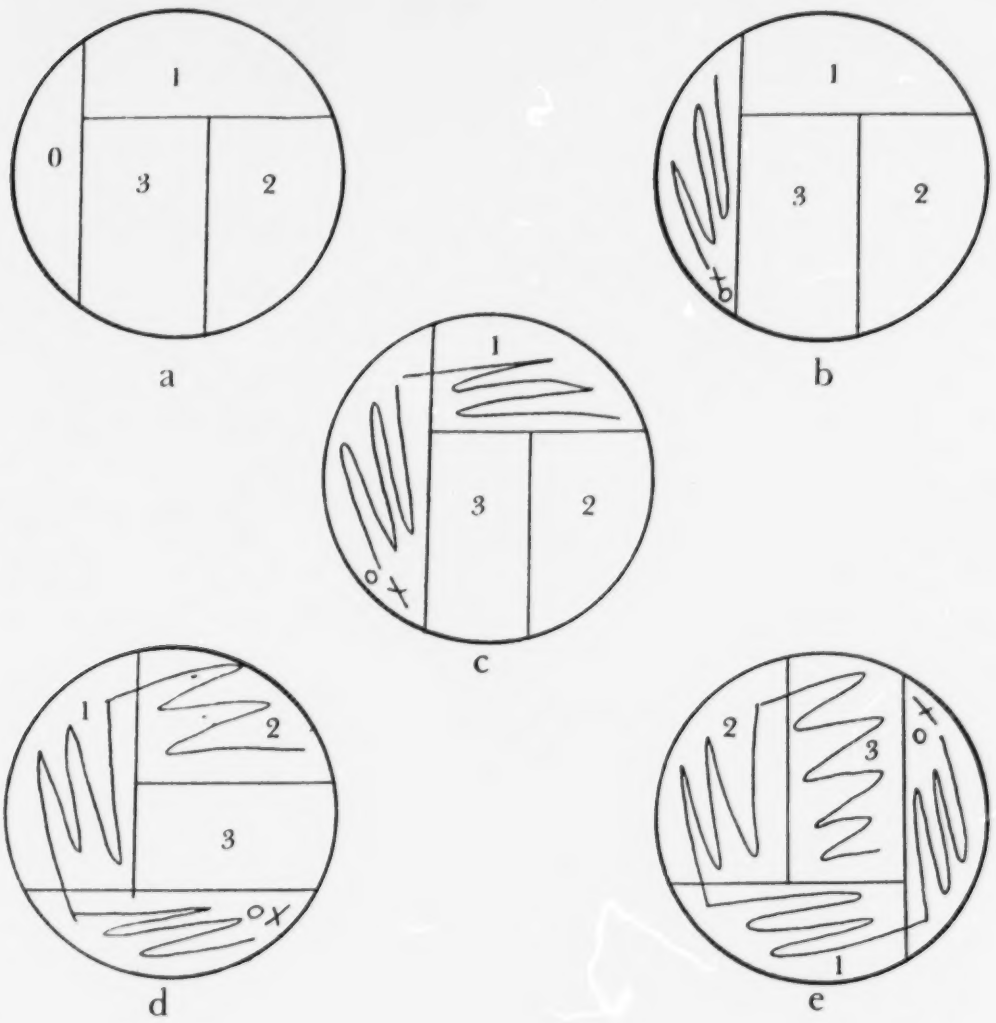
Materiales

1. Mechero
2. Encendedores electrónicos (spark lighters)
3. Agujas de inocular: rectas y con espiral
4. Hisopos estériles
5. Placas de agar
   a. Agar sangre (Blood agar)
   b. Agar chocolate (Chocolate agar)
   c. Agar McConkey (McConkey agar)
   ch. Agar sal de Mannitol (Mannitol salt agar)
6. Lápiz de cera
7. Bolsa pequeña de autoclave con su base

Procedimiento

1. Tome un hisopo estéril y páselo suavemente por las paredes de su garganta o fosas nasales. Si usted no puede solo, pida ayuda a un (una) compañero(a).
2. Inocule la placa correspondiente mediante el método de placa estriada.
   *Vea la demostración de su instructor (a).
3. Deseche el hisopo en la bolsa de autoclave.
4. Incube por 24 horas a 37°C.
5. Observe su placa e identifique las reacciones de las colonias en la placa.

Pasos a seguir para hacer diluciones en la técnica de estrías



1. Divida su placa como aparecere en la ilustración a.

2. Con su aguja de inocular, coloque una pequeña muestra de la bacteria en el sector 0. (Ver ilustración b)

   - Sector 1: representa su primera dilución. (Ver ilustración c)
   - Sector 2: representa su segunda dilución. (Ver ilustración d)
   - Sector 3: representa su tercera y última dilución. (Ver ilustración e)

Laboratorio núm. 12

Agentes desinfectantes

Existe una gran variedad de substancias químicas con propiedades antimicrobianas las cuales se conocen como **desinfectantes.** Éstas interaccionan químicamente con los microorganismos causándoles la muerte o incapacitándolos para reproducirse. Es importante ahora, separar conceptos mal aprendidos, como son desinfección y esterilidad, ya que no todos los organismos patógenos mueren por exponerse a un agente desinfectante. Las esporas, principalmente bacterianas (endosporas) son muy resistentes a la acción de los desinfectantes. Asimismo, algunos virus, como el de la hepatitis, no degeneran en presencia de un agente desinfectante.

En el 1867, Joseph Lister, utilizó el ácido carbólico diluido (fenol) con el propósito de evitar y tratar algunas infecciones obtenidas durante y después de los procedimientos quirúrgicos. Han transcurrido casi doscientos años desde entonces. Hoy día existe una gran variedad de substancias químicas cuyo mecanismo ha sido estudiado y sus propósitos antimicrobianos son utilizados en el control de poblaciones microbianas con gran efectividad.

La acción de un agente químico puede ser bactericida o bacteriostático. Se deben considerar los siguientes factores antes de utilizarlos:

1. Clase de Microorganismo- No todos los microorganismos responden de igual forma al entrar en contacto con una substancia química. Una substancia puede matar bacterias y no hongos. La presencia de cápsulas o esporas en la célula puede hacer variar los efectos del desinfectante.

   La edad de los cultivos puede causar variación, así como el grado de contaminación o el número de microorganismos presentes.

   La acción que pueda tener un desinfectante sobre el microorganismo dependerá del ambiente y grado de susceptibilidad o resistencia del mismo.

2. Naturaleza del desinfectante- Los desinfectantes se clasifican de acuerdo con sus propiedades químicas y actividad. (Vea tabla de agentes con desinfectantes).

3. Interacción entre el desinfectante y el microorganismo- Para este factor se consideran cinco variantes que son:

   a. Temperatura- La efectividad de algunos agentes depende de la temperatura. Probablemente una substancia a altas temperaturas

resulte más efectiva que a bajas temperaturas, ya que el calor disminuye la tensión superficial y puede penetrar mejor. Además, el calor aumenta el grado de disociación entre los enlaces de las moléculas que intervendrán en la desinfección.

b. Contacto- Es importante que un desinfectante entre en contacto con los microorganismos en su totalidad, evitando la interferencia producida por burbujas de aire. Si va a desinfectar un objeto en su totalidad, debe sumergirse completamente en la solución.

c. Materia orgánica- Los objetos de uso continuo que deben ser desinfectados en su totalidad, debe primero retirarse cualquier tipo de materia orgánica que tenga impregnado, tales como: sudor, sangre, pus, heces, etc., donde los microorganismos se encuentran y pueden quedar atrapados. Esta materia orgánica representa un obstáculo para el desinfectante impidiendo el efecto del agente.

ch. Tiempo- El efecto del agente va a estar limitado si no se ha dejado estar en contacto el tiempo necesario, de acuerdo con las propiedades del desinfectante.

d. pH- La efectividad de muchos agentes está directamente ligada a la acidez o alcalinidad de la solución, de acuerdo con las propiedades del agente.

e. Concentración- Éste, es uno de los puntos más importantes en la utilización de agentes químicos. Para exponer un objeto a un agente se debe conocer la concentración ideal del agente químico, específicamente en qué concentración es más reactivo. Para cada agente hay una concentración diferente.

4. Selección y evaluación de un agente desinfectante- Se realiza comparando éste con la actividad del fenol.

$$\text{Coeficiente de fenol} = \frac{\text{Dilución del desinfectante}}{\text{Dilución del fenol}}$$

Mediante este coeficiente se compara el ritmo con el cual una dilución de fenol (1/90) mata a la bacteria Salmonela typhi a 20°C en 10 minutos. Si el coeficiente de fenol es mayor de 1, el desinfectante usado es mejor que el fenol, bajo condiciones controladas de la prueba. Teniendo un parámetro de comparación se puede especular la efectividad de otros agentes químicos. Éste, no es el único criterio utilizado para la selección y evaluación de un agente químico.

Características de un buen agente desinfectante

1. Es capaz de destruir a todos los microorganismos patógenos incluyendo a los más resistentes.
2. Produce el efecto deseado en poco tiempo.
3. Es de baja concentración y no corrosivo.
4. No debe ser tóxico a los tejidos humanos.
5. Debe penetrar fácilmente (absorción).
6. Debe fijarse con facilidad (adsorción).
7. Debe ser estable a temperatura ambiente.
8. Debe ser soluble en agua.
9. Es de fácil manejo, preparación, obtención y económico.

Objetivos

1. Conocer las características de los agentes desinfectantes.
2. Entender las bases y factores esenciales al utilizar agentes desinfectantes.
3. Aprender a identificar un buen agente desinfectante.
4. Clasificar los agentes desinfectantes de acuerdo con sus propiedades.
5. Evaluar y seleccionar un buen agente desinfectante.

Materiales

1. Hisopos estériles
2. Agujas de inocular
3. Placas de agar nutriente
4. Discos de papel en blanco, estériles
5. Bolsa de autoclave con su base
6. Agentes desinfectantes

    a. Tintura de iodo
    b. Alcohol al 70%
    c. Mercurocromo (Mercurochrome)
    ch. Solución de Betadina (Betadine solution)
    d. Agua oxigenada
    e. Physoderm

7. Pinzas estériles
8. Cultivos en caldo nutriente de:

    a. Escherischia coli
    b. Staphylococcus epidermidis
    c. Bacillus subtillis (6 días)

Procedimiento

1. Tome un hisopo estéril y, mediante una transferencia aséptica, humedézcalo en un cultivo puro.
2. Inocule la placa de agar nutriente completamente, pasando suavemente (sin romper el agar) el hisopo con microorganismos por toda la superficie.
3. Tome discos en blanco, estériles, e impréguelos de la solución desinfectante que haya escogido. Repita esto por seis ocasiones con seis diferentes agentes.
4. Coloque los discos en la placa, acomodándolos para que queden equidistantes.
5. Coloque en la incubadora por 24 horas.
6. A las 24 horas observe la placa. Mida en milímetros la zona clara que se haya formado alrededor del disco, si es que sucedió. Utilice para ello una regla con medida métrica.
7. Prepare una tabla que contenga: microorganismos versus desinfectante. Compare la zona clara en mm.

Apéndice

Laboratorio núm. 12

Control microbiano - términos comúnmente usados y su significado

1. **Contaminante-** Organismo que altera la pureza de alguna cosa, como los alimentos, las aguas, el aire, etc.

2. **Contaminación-** Presencia de microorganismos en superficies animadas o inanimadas, en agua, alimentos, leches y otras sustancias alterando la pureza de los mismos.

3. **Infección-** Presencia y establecimiento de microorganismos viables en tejido de un huésped vivo.

4. **Enfermedad infecciosa-** Estado de enfermedad en un huésped vivo como resultado de una infección.

5. **Enfermedad transmisible-** Enfermedad infecciosa causada por un agente de un reservorio animal o inanimado a un huésped susceptible.

6. **Infección nosocomial-** Infección que se origina y se adquiere en un hospital o facilidad médica.

7. **Asepsis-** (Sin infección)- Se refiere a las técnicas que evitan la entrada de microorganismos.

8. **Antisepsis-** Desinfección química de la piel o cualquier tejido vivo.

9. **Antiséptico-** Agente que evita el establecimiento de una infección.

10. **Limpieza-** Remoción de materia orgánica y suciedad. No implica desinfección ni esterilización.

11. **Saneamiento-** Remoción de materia orgánica y suciedad, incluye desinfección parcial.

12. **Agente antimicrobiano-** (En contra de microorganismos)- Agentes que destruyen o eliminan los microorganismos.

13. **Agente antibacteriano-** Agente que destruye o elimina las bacterias.

14. **Antibiótico-** (En contra de la vida)- Producto microbiano que destruye o suprime otros microorganismos.

15. **Stasis-** Significa detener, inhibir el crecimiento; el microorganismo no muere y puede seguir creciendo al removerse el agente. Algunos ejemplos son:

    Bacteriostasis- Inhibición del crecimiento de bacterias.
    Fungistasis- Inhibición del crecimiento de hongos.
    Virustasis- Detención del crecimiento de virus

16. **Cida-** Sufijo que significa matador. Algunos ejemplos son:

    Germicida- Agente que mata gérmenes.
    Bactericida- Agente que mata bacterias.
    Esporicida- Agente que mata esporas.
    Fungicida- Agente que mata hongos.
    Virucida- Agente que mata virus.

17. **Desinfección química-** Destrucción de la mayor parte de los microorganismos patógenos por medio de agentes químicos.

18. **Desinfección física-** Utilización de agentes físicos en la destrucción de la mayor parte de los microorganismos patógenos.

19. **Esterilización-** Destrucción completa, remoción total de todos los microorganismos.

CLASIFICACIÓN DE DESINFECTANTES

Clase	Mecanismo de Acción	Derivados	Uso recomendado	Comentarios
FENOLES (Derivados de ácido carbólico)	Coagulación tóxica de proteínas matando las células bacterianas. Si se combina con detergentes son buenos virucidas y fungicidas.	Cresoles y bi-fenoles PhisoHex Lisol Septisol	- Desinfección de heces fecales y superficies - Desinfección general - Limpieza - Lavar la piel - Champúes	Buenos limpiadores y acción bactericida prolongada. No es esporicida. Tiene olor. Corrosivo en forma pura. Mancha. Tóxico si se usa continuamente. Se absorbe a través de la piel.
ALCOHOLES	Bactericida: Coagulación en presencia de agua. Penetra la membrana celular precipitándola. Son buenos disolventes de grasa.	Etílico 70% Isopropílico 70%	- Desinfección de termómetros (añadir iodo), instrumentos, piel y manos	No es esporicida, corroe metales, irrita las manos. Es barato y fácil de obtener. Volátil.
HALÓGENOS Iodo Cloro Bromo Fluoro Formadores de sales	Forman compuestos de proteína-halógenos (sales), en células vivas y las mata. Bactericidas. Agentes oxidantes. Limpian y desinfectan. Probablemente se combinan con enzimas proteínicas inhibiendo su actividad.	Ioduro de K, Tintura de I, Iodóforos Cloro gas Cloruro de cal Hipoclorito de sodio (clorox) Cloraminas	- Desinfección de: La piel Heridas superficiales Termómetros Paredes Pisos Muebles Agua Piscinas Heces fecales - Desinfectante y desodorante de: Laundry Suelo Objetos - Saneamiento general	Irritante de la piel y mucosa. Bromo: no se usa por su costo y toxicidad. Fluoro: caries dentales. Iodo: mancha, irritante, inestable, corrosivo, tóxico. Las cloraminas son de acción más lenta.

CLASIFICACIÓN DE DESINFECTANTES

Clase	Mecanismo de Acción	Derivados	Uso recomendado	Comentarios
METALES PESADOS	Los iones de los metales son absorbidos por las proteínas en las células. El efecto es dañino a las enzimas y la célula muere rápidamente. Los compuestos orgánicos actúan principalmente como bacteriostáticos.	Mercurio Bicloruro de mercurio Orgánicos: mercurocromo Plata: nitrato de plata Argyrol	Desinfección de la piel y superficies. Ojos-neonatales. Lápiz estíptico para parar hemorragias. Infecciones de ojos, nariz y uretra.	Los compuestos de mercurio se usan poco por ser tóxicos. En los recién nacidos hay que enjuagar bien los ojos ya que es irritante.
AGENTES "SURFACE ACTIVE"	Se acumulan en la interfase de líquidos (en sus superficies adyacentes) bajando la tensión superficial de las moléculas de forma tal que puedan unirse. Hace que los líquidos se mezclen. Las membranas de las células bacterianas constituyen "interfases" entre los complejos lipoprotéicos de las células y sus paredes y el ambiente húmedo que le rodea. Cuando estos agentes entran en contacto con las interfases microbianas, remueven las barreras que mantienen la célula separada del ambiente externo. En algunos casos la célula muere. Generalmente estos compuestos se usan mezclados con desinfectantes y así estos últimos pueden entrar mejor a las células.	Jabones Emulsificadores de grasa y aceite Detergentes Aniónicos Jabones nat. Catiónicos: Compuestos cuaternarios de amonia Ej. Cephirán	Ropa y piel Desinfectantes y agentes sanitarios	Agentes limpiadores, disolventes de grasa. No tienen efecto letal en la mayor parte de los microorganismos de la piel. Jabones sintéticos o naturales. Buenos reductores de tensión superficial. Pueden o no ionizarse en agua. Bacteriostáticos en concentraciones bajas. No son tóxicos, solubles en agua, estables, no tienen olor, no manchan, no deben mezclarse con aniónicos. son fungicidas.

CLASIFICACIÓN DE DESINFECTANTES

Clase	Mecanismo de Acción	Derivados	Uso recomendado	Comentarios
AGENTES "ALKYLATING"	Substitución de su grupo alkyl por Hidrógeno, en los radicales químicos de las proteínas microbianas, ácidos nucléicos o enzimas. Esto rompe las vías metabólicas y destruye los microorganismos.	Formaldehido Formalina 37%	Germicida líquido. Fijador de tejidos. Uso limitado como desinfectante, mata microorganismos e inactiva toxinas sin destruir propiedades antigénicas.	Tóxico, irritante, olor desagradable. Es esporicida.
AGENTES OXIDANTES	Inactivan los microorganismos y otras células efectuando un intercambio de electrones en algunos de los grupos radicales libres de sus moléculas protéicas. Si inactivan enzimas protéicas intracelulares vitales, matan la célula. Los compuestos químicos que dan O_2 pueden tener efectos bactericidas.	Peróxido de Hidrógeno 3% Perborato de Sodio $KMNO_4$ en dil. altas	Irrigantes de heridas, para evitar y controlar infección local, limpiar tejido muerto y evitar crecimiento bacteriano anaeróbico al oxigenar el área. Antiséptico uretral y tratar hongos en la piel.	Mutagénicos: En concentraciones adecuadas para la salud no son muy buenos bactericidas. Uso como antiséptico limitado.
ACEITE DE PINO	Bactericida	Derivados de destilación de raíces y ramas de pino seco.	Limpieza casera en suelos y paredes.	Eficaz contra diversas bacterias Gram negativas. Acción bactericida limitada. Agradable olor a pino.
TINTES	Bactericida, inhibir.	Violeta de Genciana	Anti-micótico, medios de cultivo, piel	Depende de la concentración y el microorganismo.

Laboratorio núm. 13

Pruebas de susceptibilidad de antibióticos

Introducción

Para poder controlar e inhibir el crecimiento de microorganismos patógenos en un huésped, se requiere, en muchas ocasiones, la utilización de agentes quimioterapéuticos que exhiban selectividad en su modo de acción. Particularmente, el tratamiento de enfermedades infecciosas, está basado en la utilización de estos agentes químicos que interfieren directamente con la proliferación de los microorganismos. El valor y eficiencia que presentan estos agentes reside en la toxicidad selectiva que exhiben. Estos se han clasificado en dos categorías:

1. Derivados de substancias metabólicas de organismos vivos o sus productos naturales (de hongos, bacterias, etc.)

2. De origen sintético en su totalidad, hechos en el laboratorio.

Substancias como sulfonamidas, ácido paraaminosalicílico, isoniazida, conthambutol, ácido nalidíxico, trimethopin, nitroferanos y el s-fluorocitosina son productos derivados de material sintético. Los antibióticos son entonces los agentes quimioterapéuticos derivados de organismos vivos, aunque en ocasiones han sido sintetizados en el laboratorio en condiciones controladas utilizando los microorganismos como fuente de producción. En muchos casos el compuesto natural inicial ha sido modificado en el laboratorio. Utilizando las moléculas básicas, se aumenta su efectividad o reactividad por sustitución o aumento de sus lugares de acción; como ejemplo tenemos la penicilina que alterada, cambia a ampicilina.

El origen de los antibióticos se explica como el desarrollo evolutivo de un mecanismo para la supervivencia de algunos organismos. La presencia de numerosos microorganismos en el terreno fomenta una competencia continua por la obtención de nutrientes. Algunos microorganismos han desarrollado mecanismos para competir en forma exitosa, asegurando así su perpetuación como especie bajo condiciones normales. La excresión de productos tóxicos capaces de inhibir el crecimiento de microorganismos vecinos, pertenecientes a otras especies, es uno de esos mecanismos. Estos inhibidores son las substancias a las cuales denominamos como antibióticos. La mayoría de estos son producidos por tres géneros de microorganismos presentes en el terreno: Bacillus, Streptomyces y Penicillum.

Al momento de juzgar el valor terapéutico de una substancia química, se toman en consideración las propiedades que debe exhibir el agente quimioterapéutico ideal:

1. Debe ser de amplio espectro: Capaz de inhibir el crecimiento de organismos tanto Gram (+) como Gram (-) o de diferentes especies, sin perder su grado de selectividad, evitando así la destrucción de la flora normal.

2. Toxicidad selectiva: No debe causar daño a las células del cuerpo o tejidos (enzimas, células plasmáticas).

3. Eficicente: No pierde sus propiedades al utilizarse o aplicarse de manera oral o parenteral.

4. No debe ser un agente sensibilizante: Al aplicarse no debe aumentar el estado de inflamación o estimular al sistema inmunológico a producir una reacción alérgica o de hipersensibilidad (estimulación negativa).

5. Bactericida: Propiedad que implica la destrucción del organismo a quien se ataca, aunque algunos sólo son bacteriostáticos (inhibir mecanismo de procreación del organismo), para evitar una reinfección.

6. No debe inducir a resistencia por agentes infecciosos con facilidad, ya que anula su poder de acción.

7. Poder ser metabolizado fácilmente, para poder eliminarlo a través de la orina.

8. Tener poder de inhibir al agente infeccioso con facilidad, lográndolo mediante el uso de la concentración o dosis mínima necesaria.

En la práctica diaria, es muy difícil hallar un agente que reúna todas las cualidades mencionadas. No obstante, siempre se trata de utilizar aquellos agentes químicos que exhiban una toxicidad mínima y selectiva (factor que dependerá de la dosis utilizada y la duración del tratamiento), que no provocan reacciones alérgicas en el (la) paciente y que al mismo tiempo reúnan el mayor número de las restantes cualidades. En algunas ocasiones es necesario decidir entre los riesgos que presenta una infección y las complicaciones que puede acarrear la quimioterapia para la misma, al emplearse substancias que presentan efectos tóxicos sobre ciertos tejidos del (de la) paciente.

Los mecanismos de acción que regulan la actividad de la mayoría de las substancias quimioterapéuticas son las siguientes:

1. Inhibición de crecimiento por antagonismo competitivo

Este mecanismo lo emplean algunos agente quimioterapéuticos de naturaleza sintética tales como las sulfonamidas, el ácido para-aminosalicílico, la isoniazida y otros. En el caso de las sulfonamidas (sulfonilamida) y el ácido paraaminosalicílico, éstos resultan ser análogos estructurales del ácido paraaminobenzoico. Este último es un metabolito esencial para algunas bacterias, utilizado en la síntesis del ácido fólico. Éste, es una vitamina del complejo B que actúa como una coenzima en la síntesis de guanina, adenina, serina, metionina y otros precursores de ácidos nucleicos y proteínas. En virtud de la similitud estructural del ácido para-aminosalicílico, estos últimos compiten con el primero por el sitio activo de la enzima que cataliza la conversión del ácido para-amino-benzoico al ácido fólico. Cuando se produce esta situación, la reacción enzimática se detiene o se forma un producto no funcional. Esto impide la formación de algunos precursores de ácidos nucleicos y proteínas, la cual a su vez provoca una inhibición del crecimiento bacteriano. La isoniazida trabaja en forma análoga, con la peculiaridad de que ésta es un análago estructural de la nicotinamida. Evita que esta última se incorpore a la molécula de DNA, un cofactor importante en el metabolismo celular.

2. Inhibición de la síntesis de pared celular

Antibióticos tales como Penicilina, Bacitracina, Restocitina, Nomomicina y Cicloserina impiden la formación o el ensamble de los componentes de la pared celular. Estos antibióticos requieren que los organismos estén trabajando activamente en la síntesis de las proteínas para desarrollar una acción efectiva contra ellos. En términos generales, son antibióticos bactericidas.

3. Inhibición de las funciones de la membrana celular

Drogas tales como la Polymixinas, Nystatina, Polienos, Valinomicina y Afotericina B provocan cambios en la permeabilidad de la membrana celular de varios microorganismos. Algunos actúan a base de su interacción con los esteroides de la membrana y otros a base de una alteración en la concentración de iones fuera y dentro de la célula. Los cambios en la permeabilidad provocan la pérdida de metabolitos esenciales y la incapacidad para ingerir los nutrientes necesarios. Esto afecta la capacidad reproductora de las células.

4. Inhibición de la síntesis de proteínas

La síntesis de proteínas puede ser inhibida por la acción de agentes tales como: Tetraciclinas, Eritromicinas, Chloranfenicol, Estreptomicina. Estos agentes interrumpen el proceso de síntesis de proteínas a nivel de la traducción del mensaje. La incapacidad para formar proteínas estructurales y las enzimas detienen el crecimiento de las bacterias.

5. Inhibición de la síntesis de ácidos nucleicos

Esta inhibición la produce el uso de antibióticos tales como: Grise fulvina, ácido nalidíxico y las rifamicinas. Algunos de estos agentes bloquean el proceso de replicación semiconservativa del DNA (repetición), mientras otras inhiben el proceso de transcripción.

Existen varios factores de importancia que deben tomarse en consideración al momento de seleccionar el agente más adecuado para inhibir una infección en particular.

1. La selección del agente está directamente dictada en primera instancia por el tipo de microorganismo envuelto en la infección. En algunas ocasiones, existe una relación directa entre la enfermedad y el organismo implicado en la misma. Ejemplos: Difteria, Corynebacteria difterial; Sífilis, Treponema pallidum. No obstante, en otras enfermedades tales como la pulmonía, el agente etiológico puede ser más de un organismo (Streptococcus pneumonia, Klebsieda, virus, micoplasma). En este caso, la selección del agente químico variará de acuerdo con el agente causal, ya que no existe uno capaz de destruir o inhibir el crecimiento de todas ellas.

2. La dosis a ser administrada al paciente, puede ser modificada por varios factores, tales como:

   a) Tiempo de eliminación de la droga
   b) Tiempo de inactivación de la droga
   c) Toxicidad potencial de la droga
   d) Edad del paciente
   e) Presencia de otras enfermedades en el paciente

   También dependerá del conocimiento que tengamos a mano sobre la concentración inhibitoria mínima en el suero del paciente. Generalmente, se recomienda una concentración (en el suero del paciente) mayor de 3 a 5 veces (en algunos casos hasta 100 veces) sobre la concentración mínima necesaria, para asegurar una terapia efectiva.

3. Método de terapia

Muchas drogas son absorbidas a través del tracto digestivo y otras son destruidas por los ácidos estomacales. Esos detalles son de suma importancia en la determinación de la vía de administración. En pacientes con síntomas severos, se prefiere utilizar una vía parenteral ya que por esta vía la droga llega con mayor rapidez al foco de infección y mantendría la concentración ideal desde un comienzo, lo que no sucede por vía oral. Dependiendo del lugar donde se localice la infección se seleccionarán diferentes antibióticos, o variantes. Por ejemplo, uno que se observa con rapidez en el tracto intestinal se utilizará para el caso de infecciones en el tracto genitourinario. Por el contrario, antibióticos que se absorben lentamente, se utilizarán para el caso de infecciones en el tracto digestivo.

4. Uso de terapia combinada (mezcla de uno o más agentes)

Esta práctica generalmente se reserva para casos de infecciones severas, causadas por más de un microorganismo. La selección de la droga dependerá de:

a) Resistencia microbiana a la droga
b) Tipo de interacción entre las drogas

1) Indiferencia- El efecto combinado no es mayor que el uso individual de ellas por separado.

2) Sinergismo- El efecto combinado es mayor que el uso individual de la droga. Ocurre con frecuencia cuando se utilizan dos agentes bactericidas. (Penicilina, estreptomicina).

3) Adición- El efecto combinado es igual a la suma de los efectos individuales.

4) Antagonismo- El efecto combinado es menor que el producido por las drogas independientemente. Sucede cuando se utilizan agentes bactericidas y bacteriostáticos (Penicilina, tetraciclina).

En la utilización de mezclas, se debe recalcar que, éstas se basan en experimentación "in vitro" y no necesariamente implican que serán electivas "in vitro".

5. Debe seleccionarse un agente con la mayor actividad bactericida posible para evitar la reexposición del (de la) paciente a la droga y así evitar el surgimiento de cepas resistentes.

6. Debe considerarse el potencial tóxico de la droga para con los tejidos del (de la) paciente.

7. El costo de la droga constituye otro elemento de juicio para la selección de las mismas cuando hay varias disponibles y todas presentan la misma efectividad.

8. El surgimiento de cepas resistentes a la acción bactericida o bacteriostática de una droga es otro factor a considerar en la selección del mejor agente. Las bacterias han desarrollado varios mecanismos para hacerse resistentes a la acción de estos agentes:

   a) Formación de enzimas que degrada la droga (penicilina).
   b) Disminución de la permeabilidad de la membrana celular a la droga (cápsula, endosporas).
   c) Utilización de trayectos metabólicos alterados a los efectos de la droga.
   d) Aumento en la síntesis de metabolitos competitivos.
   e) Eventos genéticos: transferencia de genes de resistencia a una droga de un organismo a otro, por los mecanismos de:

      1) Transducción
      2) Transformación
      3) Conjugación

La prueba de susceptibilidad de antibióticos es una de gran valor en el uso de estas substancias para el tratamiento del (de la) paciente. Cuando se aisla un microorganismo patógeno asociado a una infección, es muy conveniente conocer cómo responde éste a la acción de los antibióticos y así poder seleccionar y administrar el antibiótico más apropiado. Esta prueba es de gran utilidad en la identificación de algunos microorganismos.

La misma tiene como propósito fundamental determinar cuál o cuáles antibióticos son los más efectivos en lograr la inhibición o matar el organismo patógeno.

El método más sencillo y excelente es el diseñado por Kirby y Barces que se realiza mediante la utilización de discos con antibióticos depositados en una placa.

El procedimiento consiste en inocular una placa de agar de un medio de cultivo apropiado (bien permeable), de una forma total, con el microorganismo a estudiarse. Después se le colocarán discos de papel previamente impregnados de un antibiótico, de una manera equidistante (utilizando los métodos asépticos adecuados) sobre la superficie del agar. El antibiótico se difundirá por el medio y entrará en contacto con el microorganismo. Se incuba la placa y se extrae a las 24 horas para examinar las zonas en donde no hubo crecimiento de microorganismos. Esto resultará en que alrededor del disco, si no hubo crecimiento del organismo se formará un anillo claro donde demostrará el efecto inhibidor del antibiótico, a esta zona se le conoce como zona de inhibición.

La ausencia total de la zona es interpretada como una reacción de **Resistencia (R)** de parte del microorganismo al antibiótico utilizado, con la concentración mínima necesaria. La sola presencia de la zona clara no indica automáticamente que el microorganismo es **susceptible (S)**. Es necesario medir el diámetro de la zona en (mm) milímetros y compararlo con una lista, que se provee al efecto.

El tamaño de esa zona de inhibición es influenciado por una serie de factores, tales como:

1. Velocidad de difusión del antibiótico en el agar.
2. Tamaño del inóculo.
3. Velocidad de crecimiento de microorganismos.
4. Susceptibilidad del microorganismo a la concentración mínima del agente quimioterapéutico.

Objetivos:

1. Aprender el uso de la técnica de Kirbey y Baner para la susceptibilidad de antibióticos.
2. Comprender la naturaleza de los agentes quimioterapéuticos específicos y su modo de acción.
3. Entender el método de discriminación para la decisión de utilizar un agente quimioterapéutico específico.
4. Realizar un procedimiento común, para la determinación de uso de terapia antibiótica utilizada en los laboratorios clínicos y hospitales.

Materiales:

1. Placa de agar Mueller Hinton
2. Hisopos estériles
3. Discos de antibióticos (varios tipos)
4. Lápiz de cera

5. Cultivo en caldo nutriente de 24 horas de:

   a. Staphylococcus epidermidis
   b. Escherischia coli

6. Gradilla
7. Mecheros
8. Encendedores electrónicos (spark lighter)
9. Bolsa de autoclave (Bench size)

Procedimiento:

1. Realice una transferencia aséptica de un cultivo en caldo y extraiga un inóculo utilizando un isopo estéril.

2. Inocule una placa de agar Muller-Hinton en una forma completa.

3. Escoja seis diferentes tipos de discos de antibióticos y transfiéralos a su placa utilizando un transportador de discos con antibióticos.

4. Incube de 24 a 48 horas.

5. Observe y mida las zonas de inhibición producidas.

6. Determine la resistencia, susceptibilidad o efecto intermedio utilizando la tabla dada.

7. Prepare una tabla para vaciar la información recogida. Antibiótico vs. microorganismo vs. efectos de (R), (I), (S), determinado por la medida en milímetros tomada.

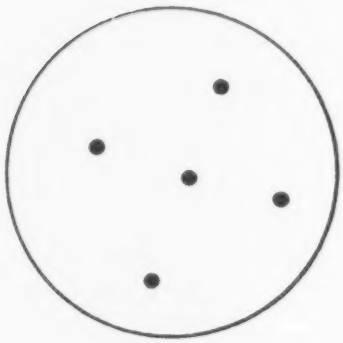
Apéndice Laboratorio núm. 13

Interpretación de la zona de inhibición

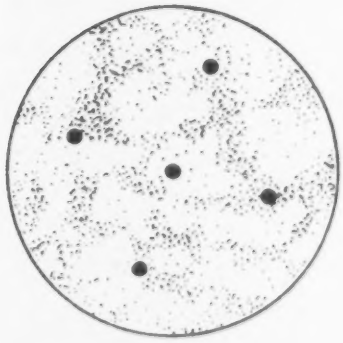
Agente Antimicrobial	Potencia del disco	Zona de inhibición en mm		
		Resistente	Intermedio	Susceptible
Amikacin	30 mg	14 or less	15 - 16	17 or more
Ampicillin				
Gram negative rods and enterococci	10 mg	11 or less	12 - 13	14 or more
Staphylococci and highly penicillin sensitive organism	10 mg	20 or less	21 - 28	29 or more
Haemophilus				20 or more
Bacitracin	10 units	8 or less	9 - 12	13 or more
Cephaloridine	30 mg	11 or less	12 - 15	16 or more
Cephalothin	30 mg	14 or less	15 - 17	18 or more
Chloramphenicol	30 mg	12 or less	13 - 17	18 or more
Colistin	10 mg	8 or less	9 - 10	11 or more
Erythromycin	15 mg	13 or less	14 - 17	18 or more
Gentamicin	10 mg			13 or more
Kanamycin	30 mg	13 or less	14 - 17	18 or more
Lincomycin	2 mg	9 or less	10 - 14	15 or more
Methicillin	5 mg	9 or less	10 - 13	14 or more
Nafcillin and oxacillin	1 mg	10 or less	11 - 12	13 or more
Nalidixic acid	30 mg	13 or less	14 - 18	19 or more
Neomycin	30 mg	12 or less	13 - 16	17 or more
Novobiocin	30 mg	17 or less	18 - 21	22 or more
Nitrofurantoin	300 mg	14 or less	15 - 16	17 or more
Oleandomycin	15 mg	11 or less	12 - 16	17 or more
Penicillin G				
Staphylococci	10 units	20 or less	21 - 28	29 or more
Other organisms	10 units	11 or less	12 - 21	22 or more
Polymyxin B	300 units	8 or less	9 - 11	12 or more
Streptomycin	10 mg	11 or less	12 - 14	15 or more
Sulfonamides	300 mg	12 or less	13 - 16	17 or more
Tetracycline	30 mg	14 or less	15 - 18	19 or more
Tobramycin	10 mg	12 or less	13 - 14	15 or more
Trimethoprim-sulfamathoxazole	1.25/23.75mg	10 or less	11 - 15	16 or more
Vancomycin	30 mg	9 or less	10 - 11	12 or more

Apéndice

Laboratorio núm. 13

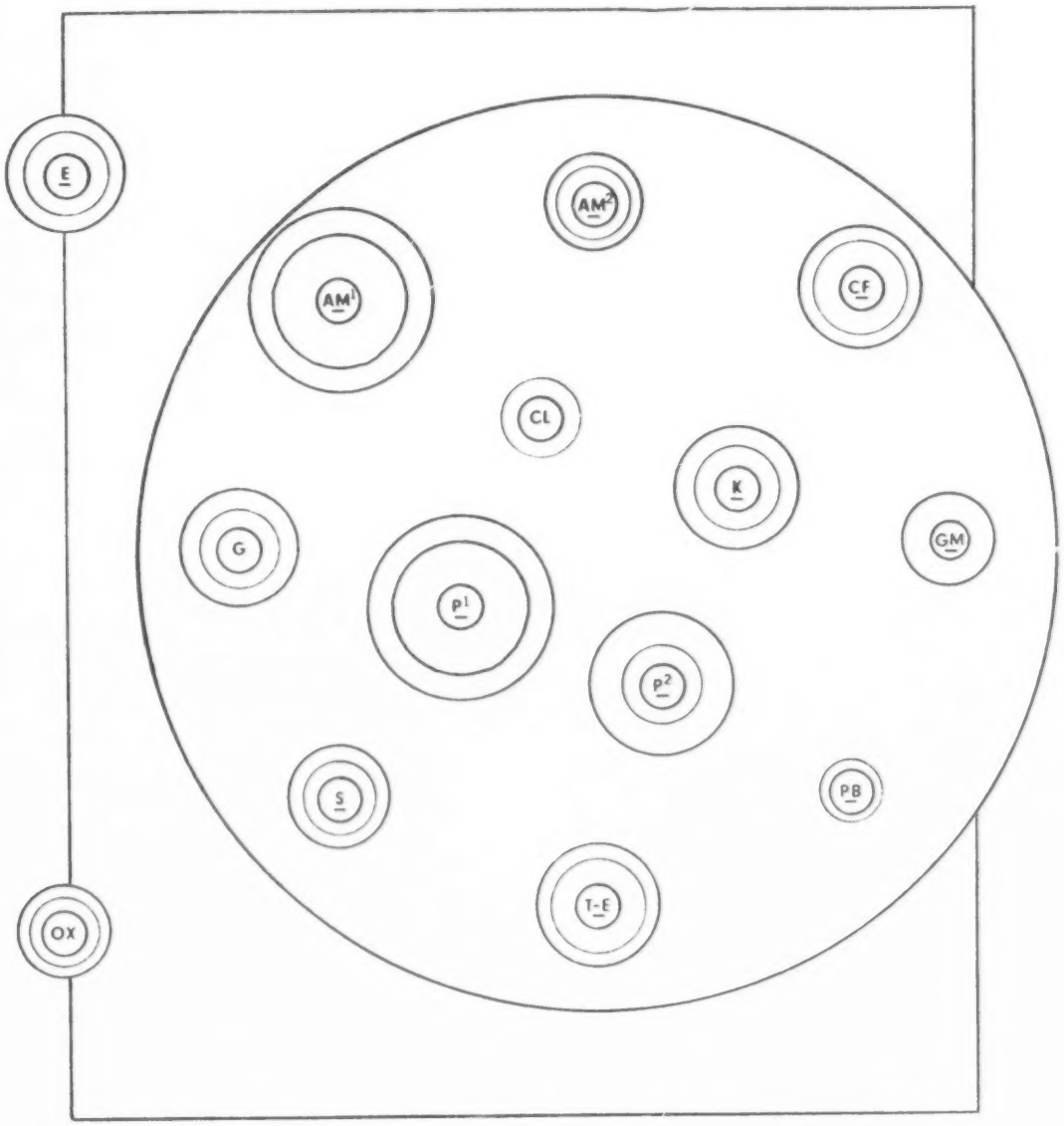


Colocación de discos de antibióticos en placa de agar



Zonas de inhibición de crecimiento en la prueba de susceptibilidad a antibióticos

ANTIMICROBIAL DISC ZONE CHART



Apéndice Laboratorio núm. 13

Algunos agentes quimioterapéuticos empleados para combatir bacterias patogenas importantes

Bacteria	Enfermedad	Tratamiento
Bacillus anthracis	Anthrax	Penicillin, tetracyclines, erythromycin
Bordetella (Haemophilus) pertussis	Whooping cough	Tetracyclines, penicillin, ampicillin
Brucella abortus and melitensis	Brucellosis, undulant fever	Tetracyclines, streptomycin
Chlamydia trachomatis	Lymphogranuloma venereum	Sulfonamides, tetracyclines
Clostridium botulinum	Botulism (food poisoning)	(Antitoxin) penicillin, kanamycin
Clostridium perfringens	Gas gangrene, wound infections	(Antitoxin) penicillin, kanamycin
Clostridium tetani	Tetanus (lockjaw)	(Antitoxin) penicillin, kanamycin
Corynebacterium diphtheriae	Diphtheria	(Antitoxin) penicillin, lincomycin
Escherichia coli	Urinary infections	Sulfonamides, kanamycin, ampicillin, nitrofurantoin (Macrodantin)
Francisella (Pasteurella) tularensis	Tularemia	Streptomycin, tetracyclines
Haemophylus ducreyi	Chancroid	Streptomycin, tetracyclines
Haemophilus influenzae	Meningitis, pneumonia	Ampicillin, streptomycin, tetracyclines
Klebsiella pneumoniae	Pneumonia	Kanamycing, neomycin, colistin, gentamicin

Bacteria	Enfermedad	Tratamiento
Mycobacterium leprae	Leprosy	Kanamycin, novobiocin, tetracyclines
Mycobacterium tuberculosis	Tuberculosis	Isoniazid, streptomycin, PAS, rifampin
Mycoplasma pneumoniae	Atypical pneumonia	Tetracyclines
Neisseria gonorrhoeae	Gonorrhea	Penicillin, tetracyclines, spectinomycin
Neisseria meningitidis	Nasopharingitis, meningitis	Penicillin, sulfonamides, ampicillin, tetracyclines
Proteus vulgaris and morgani	Gastroenteritis, urinary infections	Kanamycin, streptomycin
Pseudomonas aeruginosa	Respiratory and urogenital infections	Gentamycin, sulfonamides, kanamycin, neomycin
Rickettsia rickettsii	Rocky Mountain spotted fever	Tetracyclines, chloramphenicol
Salmonella typhi	Typhoid fever	Chloramphenicol, ampicillin, tetracyclines
Salmonella species	Gastroenteritis	Chloramphenicol, ampicillin, tetracyclines
Shigella species	Shigellosis (bacillary dysentery)	Ampicillin, tetracyclines, sulfonamides
Staphylococcus aureus	Boils, carbuncles, pneumonia, septicemia	Penicillin, erythromycin, gentamycin, lincomycin
Streptococcus pyogenes	Strep throat, scarlet fever, rheumatic fever	Penicillin, lincomycin, erythromycin
Streptococcus (Diplococcus) pneumoniae	Pneumonia	Penicillin, lincomycin, erythromycin
Treponema pallidum	Syphilis	Penicillin, erythromycin, tetracyclines
Vibrio cholerae (comma)	Cholera	Streptomycin, chloramphenicol
Yersinia (Pasteurella) pestis	Plague	Streptomycin, tetracyclines

BIBLIOGRAFÍA

1. Benson, Harold J. Microbiological Applications: A Laboratory Manual in General Microbiology. 5th. ed., Wm C. Brown Company Publisher, 1987.

2. Castrodad, Félix A, et al. Experiencias de laboratotorio en Microbiología para Enfermería. Universidad de Puerto Rico, Colegio Universitario de Humacao, Departamento de Biología, 1984.

3. Fuerst. Laboratory Manual and Work Book for Microbiology. 7th. ed., Saunders, Co., 1983.

4. Ketchum. Microbiology: An Introduction. John Wiley, 1988.

5. Pelczar and Chan. Laboratory Exercises in Microbiology. Fourth edition, McGraw Hill, 1980.

6. Tortora. Microbiology. Benjamin and Cumming, 1989.

SISTEMA DE

TECNOLOGÍA OCUPACIONAL

NOTIFICACIÓN DE POLÍTICA PÚBLICA

EL DEPARTAMENTO DE EDUCACIÓN NO DISCRIMINA POR RAZÓN DE RAZA , COLOR, SEXO, NACIMIENTO, ORIGEN NACIONAL, CONDICIÓN SOCIAL, IDEAS POLÍTICAS O RELIGIOSAS, EDAD O IMPEDIMENTO EN SUS ACTIVIDADES, SERVICIOS EDUCATIVOS Y OPORTUNIDADES DE EMPLEO.